

Etude de nouveaux biomarqueurs de toxicité induite par des micropolluants (benzo(a)pyrène et phtalate de bis(2-ethylhexyle)) sur des modèles de placenta humain

Anaïs Wakx

▶ **To cite this version:**

Anaïs Wakx. Etude de nouveaux biomarqueurs de toxicité induite par des micropolluants (benzo(a)pyrène et phtalate de bis(2-ethylhexyle)) sur des modèles de placenta humain. Toxicologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05P620 . tel-01132382

HAL Id: tel-01132382
https://theses.hal.science/tel-01132382

Submitted on 17 Mar 2015

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

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

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ECOLE DOCTORALE MEDICAMENT TOXICOLOGIE CHIMIE IMAGERIES

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

présentée et soutenue publiquement par

Anaïs WAKX

le 28 Novembre 2014

ETUDE DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE TOXICITE INDUITE PAR DES MICROPOLLUANTS (BENZO(A)PYRENE ET PHTALATE DE BIS(2-ETHYLHEXYLE)) SUR DES MODELES DE PLACENTA HUMAIN

Membres du jury :

M. le Professeur Olivier LAPREVOTE	Président
M. le Professeur François SICHEL	Rapporteur
M. le Professeur Guillaume GARÇON	Rapporteur
M. le Docteur Dominique MASSET	Examinateur
M. le Docteur Emmanuel LEMAZURIER	Examinateur
M. le Docteur Thierry FOURNIER	Examinateur
M. le Professeur Patrice RAT	Directeur de thèse

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ECOLE DOCTORALE MEDICAMENT TOXICOLOGIE CHIMIE IMAGERIES

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

présentée et soutenue publiquement par

Anaïs WAKX

le 28 Novembre 2014

ETUDE DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE TOXICITE INDUITE PAR DES MICROPOLLUANTS (BENZO(A)PYRENE ET PHTALATE DE BIS(2-ETHYLHEXYLE)) SUR DES MODELES DE PLACENTA HUMAIN

Membres du jury :

M. le Professeur Olivier LAPREVOTE	Président
M. le Professeur François SICHEL	Rapporteur
M. le Professeur Guillaume GARÇON	Rapporteur
M. le Docteur Dominique MASSET	Examinateur
M. le Docteur Emmanuel LEMAZURIER	Examinateur
M. le Docteur Thierry FOURNIER	Examinateur
M. le Professeur Patrice RAT	Directeur de thèse

Titre de la thèse : Etude de nouveaux biomarqueurs de toxicité induite par des micropolluants (benzo(a)pyrene et phtalate de bis(2-ethlyhexyle)) sur des modèles de placenta humain

Résumé : L'exposition prénatale à différents agents toxiques est généralement étudiée en considérant le placenta comme une barrière entre la mère et le fœtus ; nous le considérons en tant qu'organe cible des agents toxiques. Pour ce faire, nous avons sélectionné un modèle cellulaire de trophoblastes adapté aux études toxicologiques. En clinique, des pathologies de la grossesse sont associées à des modifications de la sécrétion de l'hormone placentaire lactogène hPL et de l'hormone gonadotrope chorionique hCG. Nos travaux *in vitro* ont permis de faire le lien entre une exposition à des micropolluants (le mono(2-ethylhexyl) phtalate, un perturbateur endocrinien, et le benzo(a)pyrene, un carcinogène) et ces observations cliniques. Les biomarqueurs de sécrétion hormonale (hPL et hCG hyperglycosylée) et de dégénérescence (activation du purinorécepteur P2X7) que nous avons identifiés permettent de détecter l'exposition et le risque suite à une exposition à des polluants.

Discipline : Toxicologie

Mots-clefs : placenta, in vitro, micropolluant, benzo[a]pyrène, phtalate de bis(2-ethylhexyle), perturbateur endocrinien, biomarqueur, hormone placentaire lactogène, hormone chorionique gonadotrope, récepteur P2X7, microenvironnement

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Olivier Laprévote, Directeur de l'unité de recherche Chimie Organique, Médicinale et Extractive et Toxicologie Expérimentale de l'Université Paris Descartes,
Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury et pour la confiance que vous m'avez accordée à la fin de mon stage de Master 2 en m'accueillant au sein du projet Placentox.

Monsieur le Professeur François Sichel, Responsable de l'équipe de Toxicologie de l'Environnement : Milieux Aériens et Cancers de l'Université de Caen Basse-Normandie,
Merci de l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Je suis sensible au fait que vous ayez accepté d'être l'un de mes rapporteurs.

Monsieur le Professeur Guillaume Garçon, Responsable du département de Toxicologie, Santé Publique, Environnement de l'Université de Lille,
Je suis touchée que vous ayez accepté de porter votre jugement sur mon travail en tant que rapporteur.

Monsieur le Professeur Patrice Rat, Responsable du Pôle Toxicologie Cellulaire et Sécurité Sanitaire de l'Université Paris Descartes,
Je vous remercie de m'avoir intégrée au sein de votre équipe et pour toute la confiance que vous m'avez témoignée depuis mon stage de Master 2. J'ai appris grâce à vous à être curieuse et autonome.

*Monsieur le Docteur Dominique Masset, Directeur de l'évaluation du P*ôle non clinique et toxicologie clinique *au sein de l'ANSM,*
Merci d'avoir accepté d'être un des membres de ce jury.

Monsieur le Docteur Emmanuel Lemazurier, Chef de projets à la Direction Scientifique de l'INERIS,
Merci d'avoir pris le temps d'examiner mon travail et de faire partie de ce jury.

Monsieur le Docteur Thierry Fournier, Directeur du laboratoire de Physiopathologie et pharmacotoxicologie placentaire humaine de l'Université Paris Descartes,
Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'avoir partagé avec moi vos larges connaissances sur tout ce qui a trait au placenta. Vous avez toujours été disponible pour une discussion et je vous en suis reconnaissante.

Monsieur le Professeur Jean-Michel Warnet,
Je vous remercie très chaleureusement pour toutes vos gentilles attentions, vos conseils, votre disponibilité et vos excellents jeux de mots.

Madame le Docteur France Massicot,
Merci pour ces moments partagés en salle de culture cellulaire et pour tes conseils tant dans le travail que sur les orchidées.

Madame le Docteur Anne Regazzetti, Monsieur le Docteur Nicolas Auzeil, Madame Delphine Dargère,
Je vous remercie pour l'aide que vous m'avez apportée dans ce travail et pour votre disponibilité pour parler des résultats de spectrométrie de masse.

Madame le Docteur Sylvie Gillet,
Merci pour toutes nos longues discussions et ton soutien tout au long de ma thèse.

Aux autres membres du laboratoire C-TAC : *Madame le docteur Françoise Baudouin, Monsieur le docteur Emmanuel Bourgogne, Madame Pascale Leproux*. Merci pour votre présence.

Aux futurs docteurs en sciences : *Monsieur Raphael Bilgraer*, merci pour toutes nos discussions très agréables depuis 4 ans, que de chemin parcouru depuis nos premiers jours ensemble au laboratoire ! Je te souhaite bonne chance pour la fin de te thèse et un très bel avenir ; *Mademoiselle Justine Lanzini*, merci pour nos conversations de « voisines de bureau », pour ton sourire et ta gentillesse ; *Mademoiselle Julia Petit* et *Mademoiselle Nouzha Oussedik*, bonne chance pour la suite (ou le début) de votre thèse, j'ai appris à vous connaître lors de votre passage en salle de culture cellulaire et je vous remercie pour ces

bons moments passés ensemble. A *Monsieur le docteur Teddy Leguillier,* merci pour nos riches discussions et pour ton enthousiasme.

Madame Martine Radionoff,

Merci pour tous ces repas partagés, pour tous tes conseils très judicieux, pour tes gâteaux renversés à l'ananas. Merci de toujours prendre le temps de m'écouter et d'être présente.

Madame Marie Gence,

Merci d'avoir partagé avec moi ta philosophie de vie et pour toutes tes gentilles attentions.

Merci aux stagiaires que j'ai encadrés au cours de ma thèse et dont le travail m'a été d'une grande utilité, en particulier *Laetitia*, *Camille* et *Margaux*.

Madame le Docteur Danièle Evain-Brion, Madame le Docteur Sophie Gil,

Je vous remercie de m'avoir acceptée dans le projet ANR Placentox et de m'avoir ainsi donné l'opportunité de faire cette thèse en collaboration avec la fondation PremUp. Merci également pour votre jugement sur mon travail lors de nos différentes réunions.

Madame le Docteur Josette Badet, *Madame le Docteur Pascale Gerbaud, Monsieur le Docteur Guillaume Pidoux, Madame Fatima Fereira,*

Merci de m'avoir fourni les cultures primaires ainsi que de nombreuses informations sur la culture des cellules placentaires. Je vous remercie également pour votre disponibilité.

Monsieur le Docteur Bruno Saubaméa, Monsieur René Lai-Kuen,

Merci de m'avoir fait bénéficier de vos précieux conseils en microscopie confocale. Je vous remercie également pour votre patience et votre disponibilité.

Madame Meryam Taghi,

Merci pour nos longues discussions. Je te souhaite bonne continuation au sein de ton laboratoire.

Madame le futur Docteur Tatiana Bedarida,

Les études nous ont séparées puis nous nous sommes retrouvées après quelques années. Merci pour tous tes conseils très précieux sur le logiciel Image J et l'utilisation de l'Odyssey. Je te remercie également pour ta bonne humeur permanente et ton énergie débordante.

Madame le Docteur Kamelia Ghazi,

Merci pour tes conseils en culture cellulaire, pour ton accueil dès mon stage de Master 2, ta bonne humeur et ton amitié.

Madame le Docteur Elodie Olivier,

Merci pour ton extrême gentillesse et pour ces longues journées passées ensemble en salle de culture cellulaire.

Madame le Docteur Mélody Dutot,

Les mots ne sont pas assez forts pour exprimer toute ma gratitude. Je te remercie infiniment pour toute l'aide que tu m'as apportée depuis mon arrivée il y a 4 ans jusqu'à ce jour. Merci pour tous tes précieux conseils tant dans les expériences que dans la réflexion. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ta franchise et pour ton amitié. Tu m'as également beaucoup aidée dans ma vie personnelle et je t'en suis très reconnaissante. Je n'oublie pas non plus tous ces bons moments passés le midi et le soir en partant du labo ni le chocolat parfois si réconfortant, parce que « c'est bon pour le moral ». Merci d'avoir cru en moi dès le début et de m'avoir ainsi soutenue.

Mes parents Pascale et Thierry Wakx,

Je vous remercie pour votre soutien au quotidien et votre amour indéfectible. Vous m'avez supportée durant mes années d'études malgré mes doutes, les hauts et les bas. Vous vous êtes toujours intéressés à ce que je faisais et m'avez poussée à le faire du mieux possible et dans les meilleures conditions. Vous m'avez énormément aidée et je n'en serai pas ici sans vous.

Benoît-Joseph Delplancke, mon âme sœur,

Merci de croire autant en moi, de me soutenir comme tu le fais. Tu as (presque) toujours raison et j'espère que cette fois tu auras encore raison. Je te remercie de m'avoir écoutée dès le début, quand je te racontais la vie au laboratoire, mes tests qui marchaient, ceux qui ne fonctionnaient pas. Merci de t'être toujours intéressé à mon travail et à ce que j'aime, bien que ce soit un domaine très éloigné du tien. Je te remercie pour tous les efforts que tu fais pour moi. Une nouvelle vie commence pour nous…

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES 21
INTRODUCTION 27
1. RAPPELS ET ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES 30
1.1. LE PLACENTA HUMAIN 30
1.1.1. Anatomophysiologie du placenta humain 31
1.1.1.1. Développement placentaire 31
1.1.1.1.1. Stade prélacunaire 32
1.1.1.1.2. Stade lacunaire 32
1.1.1.1.3. Stade villeux 32
1.1.1.2. Cytotrophoblaste villeux et villosités flottantes 33
1.1.1.3. Cytotrophoblaste extravilleux et villosités crampon 34
1.1.1.4. Placenta et cellules du système immunitaire 34
1.1.1.5. Fonctions placentaires 34
1.1.2. Anatomopathologie du placenta 37
1.1.2.1. Anomalies génétiques et/ou chromosomiques 37
1.1.2.1.1. Retard de croissance intra-utérin 37
1.1.2.1.2. Prééclampsie 38
1.1.2.1.3. Hyperplasie trophoblastique des villosités 38
1.1.2.1.4. Anomalies chromosomiques limitées au placenta 39
1.1.2.2. Facteurs environnementaux 40
1.1.2.2.1. Infections bactériennes et virales 40
1.1.2.2.2. Perturbations endocriniennes 41
1.1.2.2.2.1. Définition 41
1.1.2.2.2.2. Prise de conscience et programmes de recherche 42
1.1.2.2.2.3. Origine des PE, classification et exemples 45
1.1.2.2.2.4. Conséquences cliniques d'une exposition aux PE 47
1.1.2.2.2.5. Mélange des PE ou effet cocktail 47
1.1.2.2.2.6. Fenêtre d'exposition aux PE 49
1.1.2.2.2.7. Mécanismes d'action 50

1.1.2.2.2.7.1. Mécanismes impliquant des récepteurs : « voie génomique » et « voie rapide » 50
1.1.2.2.2.7.2. Mécanismes n'impliquant pas de récepteurs 52
1.1.2.2.2.8. Modèles d'étude des perturbateurs endocriniens in vitro 52
1.1.3. Modèles d'étude du placenta humain 57
1.1.3.1. Culture d'explants villositaires 57
1.1.3.2. Culture primaire de trophoblastes 58
1.1.3.2.1. Cytotrophoblastes villeux 58
1.1.3.2.2. Cytotrophoblastes extravilleux 58
1.1.3.3. Les lignées cellulaires trophoblastiques 59
1.1.3.3.1. Les lignées cellulaires tumorales 59
1.1.3.3.2. Les lignées cellulaires immortalisées 59
1.2. MICROPOLLUANTS 61
1.2.1. Le phtalate de bis(2-éthylhexyle), polluant de synthèse 61
1.2.1.1. Définition et exemples d'utilisation 61
1.2.1.2. Voies d'exposition 62
1.2.1.3. Métabolisme 63
1.2.1.4. Effets connus 64
1.2.1.4.1. Effets physiologiques recensés 64
1.2.1.4.2. Altérations cellulaires et moléculaires 65
1.2.1.4.2.1. Apoptose, stress oxydant et altérations mitochondriales 65
1.2.1.4.2.2. Interactions avec PPARγ 66
1.2.1.5. Réglementation concernant l'utilisation du DEHP 68
1.2.2. Le benzo(a)pyrène, polluant naturel 69
1.2.2.1. Origine 69
1.2.2.2. Voies d'exposition 70
1.2.2.3. Métabolisme et conséquences 71
1.3. MICROENVIRONNEMENT CELLULAIRE 74
1.3.1. Microenvironnement matriciel 74
1.3.1.1. Le récepteur CD44 74
1.3.1.2. Métalloprotéases 75
1.3.2. Microenvironnement lipidique 75

1.3.2.1. Récepteur P2X7 76
1.3.2.1.1. Généralités sur le récepteur P2X7 76
1.3.2.1.1.1. Agonistes 77
1.3.2.1.1.2. Antagonistes 77
1.3.2.1.1.3. Localisations subcellulaires du récepteur P2X7 78
1.3.2.1.1.4. Fonctions cellulaires du récepteur P2X7 78
1.3.2.1.2. Conséquences biologiques de l'activation du récepteur P2X7 80
1.3.2.2. Cavéoline-1 82
1.4. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE EXPERIMENTALE 83
Travaux personnels 86
2. MATERIEL ET METHODES 87
2.1. MODELES D'ETUDE *IN VITRO* 87
2.1.1. Modèles *in vitro* de cellules placentaires 87
2.1.2. Modèle *in vitro* de cellules cutanées 88
2.1.3. Modèle *in vitro* de cellules du système immunitaire 89
2.2. TECHNIQUES D'ANALYSE 90
2.2.1. Microtitration cytofluorimétrique 90
2.2.1.1. Principe de la microtitration cytofluorimétrique 90
2.2.1.2. Préparation des cellules 90
2.2.1.3. Tests réalisés en microcytofluorimétrie 91
2.2.2. Analyse par méthode immunoenzymatique 96
2.2.2.1. Principe de l'analyse par méthode immunoenzymatique 96
2.2.2.2. Préparation des cellules 96
2.2.2.3. Tests réalisés par méthode immunoenzymatique 97
2.2.3. Analyse par bioluminescence 98
2.2.3.1. Principe de l'analyse par bioluminescence 98
2.2.3.2. Test réalisé par bioluminescence 98
2.2.4. Analyse par colorimétrie 99
2.2.5. Analyse par In Cell Western 100
2.2.5.1. Principe de l'analyse par In-Cell Western 100
2.2.5.2. Tests réalisés par In-Cell Western 100
2.2.6. Analyse par Cytomérie en flux 101

2.2.6.1. Principe de la cytométrie en flux 101
2.2.6.2. Préparation des cellules 102
2.2.6.3. Tests réalisés en cytométrie en flux 102
2.2.7. Analyse par microscopie optique 103
2.2.8. Analyse par microscopie confocale de fluorescence 104
2.2.8.1. Principe de la microscopie confocale de fluorescence 104
2.2.8.2. Préparation des cellules 104
2.2.8.3. Tests réalisés en microscopie confocale de fluorescence 104
2.2.9. Analyse par spectrométrie de masse 106
3. RESULTATS 108
3.1. SELECTION DU MODELE D'ETUDE PLACENTAIRE 110
3.2. ETUDE DES EFFETS DU DEHP ET DE SON METABOLITE LE MEHP SUR LE PLACENTA : TROPHOBLASTES ET MACROPHAGES 119
3.2.1 Etude des effets du DEHP et de son métabolite le MEHP sur la lignée placentaire JEG-3 119
3.2.2 Etude des effets du MEHP sur une lignée de monocytes humains différenciée en macrophages 136
3.3. ETUDE DES EFFETS DU BaP SUR LA LIGNEE CELLULAIRE JEG-3 145
3.4. ETUDE DES EFFETS DU BaP SUR LA LIGNEE HACAT 178
4. DISCUSSION GENERALE 184
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 194
BIBLIOGRAPHIE 197
ANNEXES 230

VALORISATION DE NOS TRAVAUX DURANT CETTE THESE

❖ PUBLICATIONS INTERNATIONALES ISSUES DE NOS TRAVAUX DANS DES REVUES A COMITE DE LECTURE

- Brevet. Une partie de nos travaux est intégrée dans un brevet d'invention déposé à l'INPI en 2014.

Co-inventeur : **Anaïs WAKX**

Titre : Nouveaux biomarqueurs de danger et de risque pour l'évaluation de polluants et perturbateurs endocriniens sur des modèles placentaires humains - Mise en place d'un kit pour l'évaluation des risques et la sécurité sanitaire.

- Publication 1. Article original soumis dans la revue European Journal of Pharmaceutical Sciences

Anaïs WAKX, Anne REGAZZETTI, Delphine DARGERE, Nicolas AUZEIL, Sophie GIL, Danièle EVAIN-BRION, Olivier LAPREVOTE, Patrice RAT

Use of placenta as a target organ to study chemicals toxicity: role of P2X7 receptor and lipid raft modification in benzo[a]pyrene toxicity

- Publication 2. Article original soumis dans la revue Nutrition & Metabolism

Anaïs WAKX, Mélody DUTOT, France MASSICOT, Patrice RAT

Amyloid β peptide induces apoptosis through P2X7 cell death receptor in retinal cells: modulation by marine omega-3 fatty acid DHA and EPA.

- Publication 3.

Anaïs Wakx, Mélody Dutot, Patrice Rat

New biomarkers for endocrine disruption evaluation on microplate using a human placental cell line.

Placenta, 35 (2014), Issue 9, A19, P1.29-N

- Publication 4.

Patrice Rat, **Anaïs Wakx**, Mélody Dutot, Bérengère De Moucheron, Olivier Laprévote, Jean-Michel Warnet

Beta-Amyloid induces toxic degenerative pathways on human retinal cells with P2X7 cell death receptor activation: Role in Age-Related Macular Degeneration (AMD).

Tox. Lett. 205, S240 (2011), DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.05. 819

- Publication 5.

Patrice Rat, **Anaïs Wakx**, Bérengère De Moucheron, Mélody Dutot, Olivier Laprévote

Evaluation and modulation of toxic degenerative pathways induced by beta-amyloid on retinal cells: role of P2X7 cell death receptor.

Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association, 7, Issue 4, Supplement, S379-S380

- Publication 6. Article original soumis dans la revue Toxicology in vitro

Mélody DUTOT, Kamelia GHAZI, **Anaïs WAKX**, Roxane FAGON, Patrice RAT

Microplate cytometry for high throughput screening cell viability assays: importance of the chemical properties of tested products

❖ CONGRES INTERNATIONAUX

- Alzheimer's Association 2011 International Conference on Alzheimer's Disease, Paris, France, Juillet 2011

  Evaluation and modulation of toxic degenerative pathways induced by β-amyloid peptide on retinal cells: role of P2X7 cell death receptor

  ***Anaïs Wakx**, Bérengère De Moucheron, Mélody Dutot, Olivier Laprévote, Patrice Rat*

- Eurotox, Paris, France, Août 2011

  β-amyloid induces toxic degenerative pathways on human retinal cells with P2X7 cell death receptor activation: role in age-related macular degeneration (AMD)

  ***Anaïs Wakx**, Mélody Dutot, Bérengère De Moucheron, Olivier Laprévote, Jean-Michel Warnet, Patrice Rat*

- **Colloque international du Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE)**, Paris, France, Décembre 2012.

  Evaluation des mécanismes d'action toxiques et des perturbations hormonales induits par le di(2-ethylhexyl)phtalate (DEHP) et le monoethylhexylphtalate (MEHP) sur un modèle de cellules placentaires humaines

  ***Anaïs Wakx**, Margaux Jullien, Patrice Rat*

- **7th Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters**, Copenhague, Danemark, Mai 2013.

  Study of toxic mechanisms and endocrine disruption induced by di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and monoethylhexylphthalate (MEHP) on a human placental cell model

  ***Anaïs Wakx**, Margaux Jullien, Patrice Rat*

- **18th International Congress on *in vitro* Toxicology (ESTIV2014)**, Egmond An zee, Pays-Bas, Juin 2014.

  Placental cell line: a new *in vitro* human model to study environmental pollutants toxicity

  ***Anaïs Wakx**, Elodie Olivier, Patrice Rat*

- 9**th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences**, Prague, République Tchèque, Août 2014.

  New biomarkers for endocrine disruption evaluation on microplate using a human placental cell line

  ***Anaïs Wakx**, Mélody Dutot, Patrice Rat*

- **International Federation of Placenta Associations Meeting**, Paris, France, Septembre 2014.

  New biomarkers for endocrine disruption evaluation on microplate using a human placental cell line

  ***Anaïs Wakx**, Mélody Dutot, Patrice Rat*

❖ CONGRES NATIONAUX

- **Congrès annuel de la Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire**, Paris, Juin 2013.

  Cellules placentaires humaines : un modèle pour identifier les effets du benzo(a)pyrène sur la grossesse grâce à de nouveaux biomarqueurs d'évaluation du risque

  ***Anaïs Wakx**, Nicolas Auzeil, Delphine Dargère, Anne Regazetti, Mélody Dutot, Olivier Laprévote, Patrice Rat*

- **Congrès annuel de la Société Française d'Ophtalmologie (SFO)**, Paris, Juin 2013.

  β-Amyloid peptide induces apoptosis with P2X7 cell death receptor activation: modulation by omega-3 fatty acid

  ***Anaïs Wakx**, Mélody Dutot, Jean-Michel Warnet, Patrice Rat*

❖ École Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie et Environnement / Imageries

- **Journées de l'Ecole Doctorale**, Paris, Avril 2013.

  Cellules placentaires humaines : un modèle pour identifier les effets du benzo(a)pyrène sur la grossesse grâce à de nouveaux biomarqueurs d'évaluation du risque

  ***Anaïs Wakx**, Nicolas Auzeil, Delphine Dargère, Anne Regazetti, Mélody Dutot, Olivier Laprévote, Patrice Rat*

- **Journées de l'Ecole Doctorale**, Paris, Avril 2014.

  La lignée placentaire humaine : un nouveau modèle d'étude in vitro de la toxicité induite par des polluants environnementaux tels que le benzo[a]pyrène

  ***Anaïs Wakx**, Patrice Rat*

ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AR	Récepteur aux Androgènes
ARE	Elément de Réponse aux Androgènes
BaP	Benzo[a]pyrène
BPDE	BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde
BSA	Albumine de Sérum Bovin
CYP19	Cytochrome P450 Aromatase codée par le gène Cyp19
DEHP	Phtalate de bis(2-éthylhexyle)
DHA-S	déhydroépiandrostérone
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ER	Récepteurs aux œstrogènes
ERE	Elément de Réponse aux œstrogènes
hCG	Hormone chorionique gonadotrope humaine
hPL	Hormone Placentaire Lactogène humaine
MEHP	Phtalate de mono(2-éthylhexyle)
MMP	Matrix Metalloproteinase
NAO	10-N-nonyl Acridine Orange
PBS	Tampon Phosphate Salin
PE	Perturbateur Endocrinien
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TCDD	2,3,7,8, tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TIMP	Tissue Inhibitor or Metalloproteinase
ZO-1	Zonula Occludens-1

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES

Figure 1 : Le placenta humain 31

Figure 2 : Représentation schématique des étapes du développement placentaire humain 33

Figure 3 : Schéma de la synthèse des stéroïdes par le placenta et le fœtus 36

Figure 4 : Illustration des différents types d'anomalies chromosomiques limitées au placenta 40

Figure 5 : Formules chimiques de divers perturbateurs endocriniens : diethylstilbestrol, 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine et bisphénol A 44

Figure 6 : Voies de signalisation impliquant des récepteurs 51

Figure 7 : Schéma représentant le principe de la technique du gène rapporteur 54

Figure 8 : Schéma représentant le principe du test YES 55

Figure 9 : Structure chimique du DEHP 61

Figure 10 : Métabolisation du DEHP 64

Figure 11 : Structure générale du récepteur PPARγ 67

Figure 12 : Les ligands naturels, agonistes synthétiques et es antagonistes de PPARγ 67

Figure 13 : Structure chimique du BaP 70

Figure 14 : Métabolisation simplifiée du BaP 72

Figure 15 : Schéma de l'ouverture du pore cytolytique P2X7 80

Figure 16 : Observations cliniques et marqueurs associés 84

Figure 17 : Tapis de cellules BeWo 88

Figure 18 : Tapis de cellules JEG-3 88

Figure 19 : Tapis de cellules HaCat 89

Figure 20 : Tapis de cellules U937 différenciées en macrophages 89

Figure 21 : Viabilité cellulaire (BaP) 111

Figure 22 : Analyse du pic SubG1 112

Figure 23 : Viabilité cellulaire (BaP) 114

Figure 24 : Viabilité cellulaire (DEHP) 115

Figure 25 : Tapis cellulaire de cellules BeWo 116

Figure 26 : Tapis cellulaire de cellules JEG-3 117

Figure 27 : Viabilité cellulaire (DEHP) 120

Figure 28 : Viabilité cellulaire (MEHP) 121

Figure 29 : Activation du récepteur PPARγ (MEHP) 122

Figure 30 : Sécrétion hormonale (MEHP) 123

Figure 31 : Viabilité cellulaire et sécrétion hormonale (bisphénol A) 124

Figure 32 : Viabilité cellulaire et sécrétion hormonale (testostérone et 17β-œstradiol) ... 126

Figure 33 : Potentiel transmembranaire mitochondrial (MEHP) 127

Figure 34 : Masse mitochondriale (MEHP) 128

Figure 35 : Activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale (MEHP) 128

Figure 36 : Activité de la caspase 8..... 129

Figure 37 : Activité de la caspase 3..... 130

Figure 38 : Condensation de la chromatine (MEHP) 130

Figure 39 : Expression du récepteur P2X7..... 131

Figure 40 : Activation du récepteur de dégénérescence P2X7 (MEHP) 132

Figure 41 : Viabilité cellulaire (MEHP) 136

Figure 42 : Potentiel transmembranaire mitochondrial (MEHP) 137

Figure 43 : Activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale (MEHP) 138

Figure 44 : ATP intracellulaire 139

Figure 45 : Activation du récepteur P2X7 (MEHP) 140

Figure 46 : Relargage d'IL-1β et de TNF-α 141

Figure 47 : Viabilité cellulaire (BaP) 146

Figure 48 : Activité du CYP1A1 147

Figure 49 : Détection du BaP et de ses métabolites 148

Figure 50 : Condensation de la chromatine (BaP) 150

Figure 51 : Analyse du pic SubG1 151

Figure 52 : Potentiel transmembranaire mitochondrial (BaP) 152

Figure 53 : Masse mitochondriale (BaP) 153

Figure 54 : Activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale (BaP) 153

Figure 55 : Peroxydation lipidique (BaP) 154

Figure 56 : Niveau de glutathion oxydé 155

Figure 57 : Activité du facteur de transcription NRF2 155

Figure 58 : Expression de l'histone γH2AX 156

Figure 59 : Evaluation de la quantité d'ADN double brin 157

Figure 60 : Sécrétion hormonale (BaP) 158

Figure 61 : Activation du récepteur PPARγ (BaP) 159

Figure 62 : Dosage de l'inhibiteur de métalloprotéases TIMP-1 160

Figure 63 : Expression du récepteur CD44 161

Figure 64 : Migration cellulaire 162

Figure 65 : Expression de la protéine ZO-1 164

Figure 66 : Expression des phosphatidylsérines dans le feuillet externe de la membrane plasmique 165

Figure 67 : Expression de la protéine cavéoline-1 166

Figure 68 : Expression du récepteur P2X7 (BaP) 167

Figure 69 : Contenu en calcium 168

Figure 70 : Activation du récepteur P2X7 (BaP) 169

Figure 71 : Prolifération cellulaire 170

Figure 72 : Cycle cellulaire 171

Figure 73 : Niveau de protéine p53 phosphorylée 172

Figure 74 : Viabilité cellulaire (BaP) 178

Figure 75 : Activité du CYP1A1 179

Figure 76 : Péroxydation lipidique (BaP) 180

Figure 77 : Ouverture des pores de perméation P2X7 (BaP) 180

Figure 78 : Comparaison de la sécrétion hormonale par les cellulesJEG-3 et les cellules HaCaT..... 181

Figure 79 : Observations cliniques et biomarqueurs associés 195

Tableau 1 : Tableau de classification des PE 46

Tableau 2 : Différentes formes d'hCG et phénomènes associés 84

Tableau 3 : BaP et ses métabolites oxydés 149

Annexe A. Article 1 : Role of P2X7 receptor and lipid raft modifications in benzo[a]pyrene toxicity on human placental cells 225

Annexe B. Article 2 : Amyloid β peptide induces apoptosis through P2X7 cell death receptor in retinal cells: modulation by marine omega-3 fatty acid DHA and EPA 262

Annexe C. Article 3 : Microplate cytometry for high throughput screening cell viability assays: importance of the chemical properties of tested products 285

INTRODUCTION

Le placenta est un organe transitoire nécessaire à la croissance du fœtus et au bon déroulement de la grossesse. Il est particulièrement sensible aux hormones qui lui envoient des signaux spécifiques. En retour, il sécrète également des hormones qui exercent une action tant sur la mère que sur le fœtus et sur lui-même. Toute molécule perturbant cet équilibre hormonal ou la fonction placentaire peut avoir un retentissement sur le déroulement de la grossesse, la croissance du fœtus mais aussi sur la santé de l'enfant à naître. La femme enceinte est donc spécialement sensible aux polluants qui l'entourent, et plus spécifiquement aux micropolluants. Un polluant est défini comme étant une substance présente dans l'environnement résultant au moins en partie de l'activité humaine et ayant des effets délétères sur les organismes vivants. Les polluants exerçant leurs effets délétères à de faibles concentrations, inférieures au µg/L, sont dits micropolluants. Les polluants et micropolluants peuvent se bioaccumuler au niveau du placenta car il existe en son sein un fort débit sanguin comparativement au reste de l'organisme maternel. De plus, certains polluants sont retrouvés à des concentrations de l'ordre du micromolaire dans le cordon ombilical. Le placenta semble donc être un organe cible de micropolluants particulièrement intéressants à étudier.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de l'ANR Placentox dans lequel notre rôle a été l'étude de la cytotoxicité induite par le benzo[a]pyrène et du phtalate de bis(2-ethylhexyle) sur le placenta. Nous proposons dans ce manuscrit d'étudier la cytotoxicité de ces micropolluants mais également de mettre en évidence des biomarqueurs de perturbation endocrinienne ainsi que des biomarqueurs de dégénérescence suite à l'exposition de modèles placentaire à des micropolluants.

Dans un **premier temps**, nous nous avons sélectionné un modèle placentaire adapté aux études toxicologiques. En effet, il existe différents modèles de cellules placentaires mais certains semblent plutôt à privilégier pour les études de la physiologie placentaire tandis que d'autres semblent mieux adaptés à la toxicologie.

La viabilité cellulaire et la fragmentation de l'ADN ont été étudiées respectivement par microtitration cytofluorimétrique et cytométrie en flux.

Dans un **deuxième temps**, nous nous sommes intéressée aux effets sur le placenta mais aussi sur des cellules du système immunitaire d'un micropolluant particulier, connu pour être un perturbateur endocrinien, le phtalate de bis(2-éthylhexyle).

Les mécanismes apoptotiques déclenchés par ce micropolluant ainsi que les altérations mitochondriales et la dérégulation hormonale induites par ce perturbateur endocrinien ont été étudiés sur le modèle placentaire précédemment sélectionné, afin de déterminer des biomarqueurs d'exposition. De plus, ses effets pro-inflammatoires sur modèle des cellules du système immunitaire ont été évalués par la technique ELISA.

Dans un **troisième temps**, les effets sur le placenta d'un autre type de micropolluant, le benzo[a]pyrène qui est une molécule carcinogène, ont été étudiés afin d'identifier un biomarqueur de dégénérescence cellulaire mais également une perturbation endocrinienne.

La métabolisation du benzo[a]pyrène, la viabilité cellulaire, les effets clastogènes, les altérations mitochondriales, le stress oxydant, la perturbation des microenvironnements matriciel et lipidique et la sécrétion hormonale ont été évalués par différentes techniques : microscopie confocale, In Cell Western, microtitration fluorimétrique, colorimétrie, bioluminescence, cytométrie en flux, technique ELISA et spectrométrie de masse.

Nous ferons tout d'abord un rappel sur la physiologie et la physiopathologie du placenta humain. Nous consacrerons ensuite un chapitre sur les deux micropolluants utilisés dans notre étude, le phtalate de bis(2-éthylhexyle) et le benzo[a]pyrène, puis un chapitre sur le microenvironnement cellulaire comprenant les microenvironnements matriciel et lipidiques. Après avoir décrit le matériel et méthodes utilisés dans notre étude, nous décrirons l'ensemble des résultats que nous avons obtenus avant de tirer les principaux enseignements de notre travail.

1. RAPPELS ET ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

1.1. LE PLACENTA HUMAIN

Le placenta est un organe transitoire permettant la croissance et le développement du fœtus grâce à son rôle de barrière et ses fonctions d'échange gazeux et nutritifs. Cette annexe embryonnaire est indispensable pour le maintien de la grossesse. Il se met en place rapidement, dès le 8ème jour après la fécondation, quand le blastocyste a épuisé ses réserves nutritives. Il représente une interface entre l'endomètre de la mère et le fœtus ; il est la résultante du développement d'un système membranaire fœtal au centre duquel se trouve le fœtus et dont le lien avec les membranes est le cordon ombilical (Naidu et al. 2007).

Le placenta humain a la forme d'un disque, est composé de villosités choriales et est caractérisé par une invasion majeure du trophoblaste le conduisant au contact du sang maternel (Figure 1). La placentation humaine est de type hémomonochoriale, c'est-à-dire qu'une unique couche de cellules placentaires sépare les circulations sanguines maternelles et fœtales.

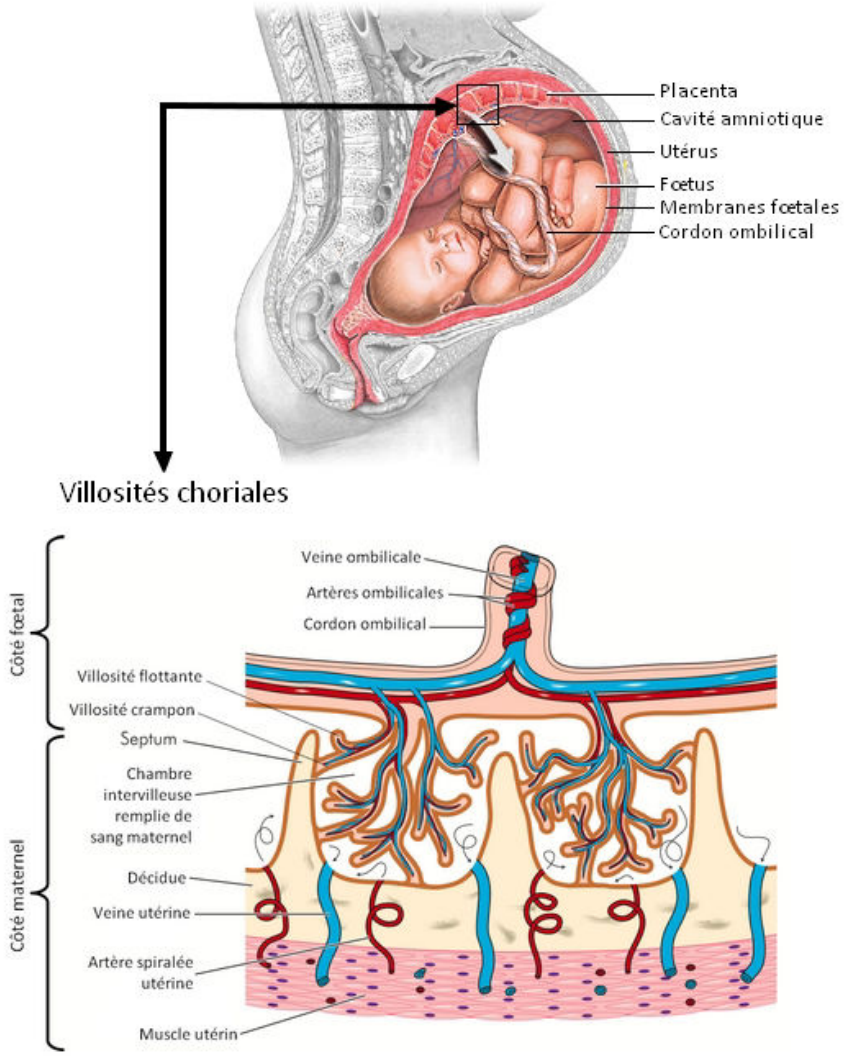


Figure 1 : Le placenta humain *(d'après the American Accreditation Health Care Commission, 2008).*

1.1.1. Anatomophysiologie du placenta humain

1.1.1.1. Développement placentaire

Le développement du placenta se déroule en trois étapes : les stades prélacunaire, lacunaire et villeux.

1.1.1.1.1. Stade prélacunaire

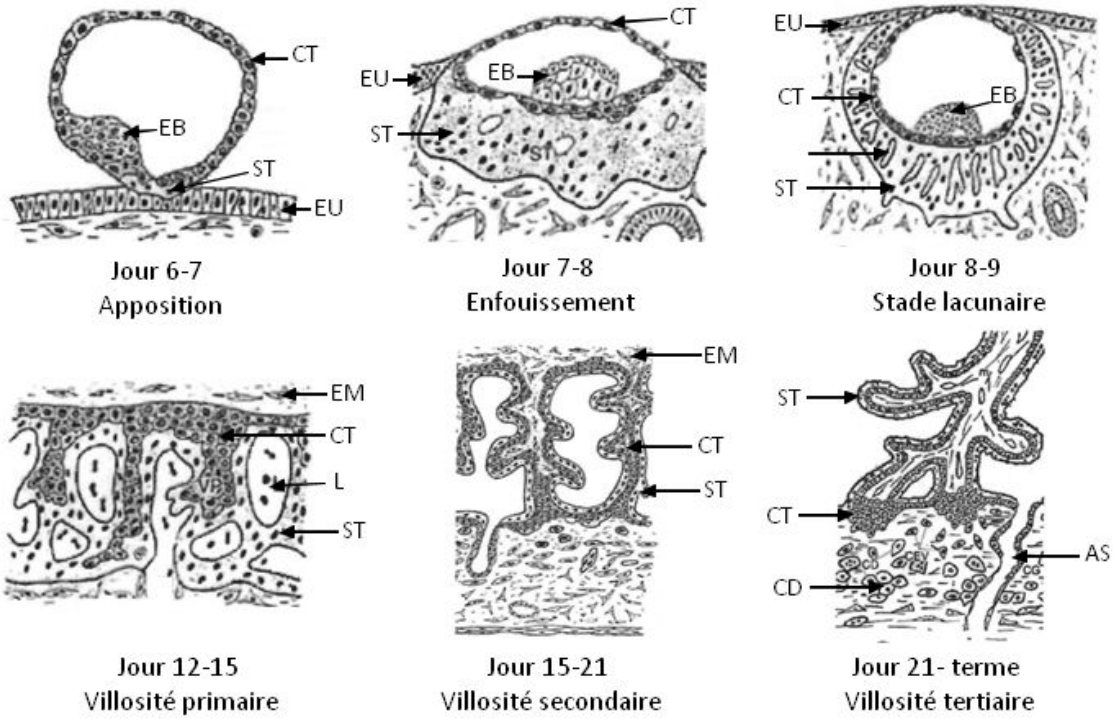
Après fécondation, l'ovocyte se transforme rapidement en blastocyste. Ce dernier est entouré d'une assise de cellules externes mononucléées nommée trophectoderme ou trophoblaste à partir desquels se forme le placenta. Dès qu'un contact est établi entre l'épithélium de l'endomètre maternel et le pôle embryonnaire du blastocyste, les cellules du trophectoderme se différencient en deux couches cellulaires distinctes : une assise cellulaire interne de cellules capables d'activité mitotique intense, les cytotrophoblastes, et une couche externe de syncytiotrophoblastes (figure 2). Cette dernière provient de la fusion des cytotrophoblastes, cellules mononucléées, en cellules plurinucléées et polarisées. Le syncytiotrophoblaste possède une activité protéolytique intense. Il peut ainsi pénétrer l'épithélium utérin et envahir l'endomètre afin d'enfouir le blastocyste : c'est la nidation.

1.1.1.1.2. Stade lacunaire

Environ 8 jours après la fécondation, des vacuoles apparaissent dans la masse syncytiale suite à la dégradation de la matrice extracellulaire par le syncytium. Ces vacuoles forment progressivement des lacunes délimitant des travées syncytiales (Figure 2). A ce stade, l'implantation de l'œuf au sein de la paroi utérine est totale.

1.1.1.1.3. Stade villeux

Vers le 12ème jour, les cytotrophoblastes qui étaient limités à une assise cellulaire interne prolifèrent et envahissent les travées de la masse syncytiale, formant ainsi les villosités choriales primaires (Figure 2). En parallèle, les vacuoles formées par les travées syncytiales se remplissent de sang maternel pour constituer les lacs sanguimaternels ou chambres intervilleuses. A partir du 15ème jour post-fécondation, les villosités primaires sont envahies par du mésenchyme allantoïdien d'origine embryonnaire et forment les villosités secondaires. Des capillaires fœtaux apparaissent alors dans l'axe mésenchymateux de la villosité choriale, ce qui détermine la structure tertiaire de la villosité environ trois semaines après la fécondation. A terme, le placenta est un disque de 20 cm de diamètre et de 3 cm d'épaisseur et pèse environ 500g. L'arbre villositaire comprend des villosités crampons ancrées dans l'endomètre maternel et des villosités flottantes baignant dans la chambre intervilleuse.



EB : bouton embryonnaire, CT : cytotrophoblastes, ST : syncytiotrophoblaste, EU : endothélium utérin, EM : mésoderme embryonnaire, L : lacune, AS : artère spiralée, CD : cellule déciduale

Figure 2 : Représentation schématique des étapes du développement placentaire humain *(d'après Benirschke et Kaufmann (Benirschke and Kaufmann 2000))*

1.1.1.2. Cytotrophoblaste villeux et villosités flottantes

Dans sa structure définitive, la villosité choriale est composée d'un axe de mésenchyme embryonnaire contenant les vaisseaux fœtaux. Cet axe est entouré de cytotrophoblastes reposant sur une membrane basale ; ces derniers sont dits villeux. Le syncytiotrophoblaste qui les entoure constitue la couche la plus externe de la villosité et se trouve directement en contact avec la cavité lacunaire remplie de sang maternel. Les circulations maternelles et fœtales ne se mélangent jamais ; les capillaires fœtaux sont séparés du sang maternel par l'endothélium des vaisseaux fœtaux, le mésenchyme et le syncytiotrophoblaste. La membrane apicale des syncytiotrophoblastes comporte de nombreuses microvillosités se

projetant dans la chambre intervilleuse. Elles constituent une zone privilégiée d'échanges entre la mère et le fœtus.

1.1.1.3. Cytotrophoblaste extravilleux et villosités crampon

Le placenta est caractérisé par une invasion profonde de l'endomètre utérin par les cytotrophoblastes extravilleux au cours du premier trimestre de la grossesse. Le cytotrophoblaste extravilleux est caractérisé par ses capacités invasives et prolifératives.

Les cytotrophoblastes extravilleux sont localisés à la base de la villosité crampon. Ils sont agrégés les uns aux autres, reposant sur une membrane basale. A la base de la villosité, les cellules sont hautement prolifératives puis elles se différencient en cytotrophoblastes très invasifs, acquièrent un phénotype mésenchymateux et colonisent l'endomètre et le myomètre. L'invasion trophoblastique est limitée au tiers supérieur de l'endomètre grâce à une régulation impliquant des facteurs solubles sécrétés par les cellules déciduales de l'endomètre et modulant la synthèse de protéases et de protéines matricielles (Bischof et al. 2000). De plus, l'invasion est orientée et sélective car les cytotrophoblastes extravilleux n'envahissent que les parois des artères utérines et pas les veines ; ils ne dégradent que la tunique élastique artérielle.

1.1.1.4. Placenta et cellules du système immunitaire

Le placenta, de par son lien étroit avec la circulation maternelle, est en contact avec des monocytes maternels (Basu et al. 2011). De plus, il est également riche en macrophages, alors nommés cellules de Hofbauer, présents dans les villosités choriales (Bulmer and Johnson 1984). Des macrophages déciduels sont aussi détectés dans la décidue de l'endomètre maternel (Houser 2012; Nehemiah et al. 1981).

1.1.1.5. Fonctions placentaires

Le placenta possède différentes fonctions, physiques, pour assurer la protection mécanique du fœtus face à des chocs grâce au liquide amniotique contenu dans la cavité amniotique, et biologiques.

Une des fonctions biologiques les plus évidentes et essentielles du placenta est de coordonner les échanges gazeux et nutritifs. La villosité choriale étant l'unité fonctionnelle du placenta, les échanges fœtaux-maternels ont lieu dans la chambre intervilleuse au niveau des villosités flottantes (Evain-Brion 2001). Les capillaires fœtaux sont alors séparés de la circulation maternelle par une unique couche de cellules syncytiales et les échanges peuvent avoir lieu par diffusion simple, facilitée, par transport actif ou par endocytose.

Une autre fonction connue du placenta est sa fonction de barrière protectrice face aux agents pathogènes et produits toxiques grâce à sa richesse en monocytes et macrophages comme nous l'avons précédemment décrit. Il exerce une fonction de filtre pour limiter le passage de ces agents vers le fœtus et ainsi protéger son développement. Toutefois, son pouvoir filtrant varie selon les agents infectieux et produits toxiques considérés. Par exemple, les agents infectieux sont principalement stoppés sauf les virus tels que le VIH, la rubéole ou les hépatites. De même, parmi les produits toxiques et les médicaments, la majorité est arrêtée tandis que l'alcool, les opiacés et les rétinoïdes peuvent atteindre le fœtus.

Les cellules fœtales placentaires dérivant de la mère et du père, la grossesse peut être comparée à la greffe d'un organisme « étranger » dans l'organisme maternel ; il pourrait donc potentiellement être rejeté par la mère. Or ce n'est pas le cas ; il existe donc une tolérance immunologique dans l'environnement placentaire (Gaunt and Ramin 2001; Torry et al. 1997; Yokoyama 1997). Pour cela, les cellules trophoblastiques n'expriment pas le complexe majeur d'histocompatibilité de type II, protégeant le placenta de la destruction par les lymphocytes maternels (Parham et al. 2012). De plus, des cellules du cytotrophoblastes extravilleux expriment des Human Leucocyte Antigen tels que HLA-C, -E et -G qui inhibent l'action des cellules Natural Killer du système immunitaire. Le placenta joue donc un rôle de barrière anatomique continue entre les tissus fœtaux et maternels et contribue ainsi à la tolérance immunologique du fœtus par la mère. De plus, le placenta contribue à l'immunisation du fœtus, en laissant passer les immunoglobulines G maternelles, immunoglobulines que le fœtus ne peut synthétiser lui-même, à l'inverse des immunoglobulines M qui traversent peu la barrière placentaire mais sont synthétisées par le fœtus (Ben-Hur et al. 2005; Friden et al. 1994; Kohler and Farr 1966; Simister 2003).

La sécrétion hormonale est une autre fonction très importante du placenta. Elle exerce un rôle prépondérant dans le déroulement de la grossesse, le développement fœtal et la parturition. Différentes hormones sont sécrétées par le syncytiotrophoblaste, des hormones stéroïdes mais aussi des hormones peptidiques. Parmi les hormones stéroïdes, le placenta produit et secrète dès la 8ème semaine de grossesse de la progestérone et des œstrogènes tels que l'œstradiol, l'œstrone et l'œstriol. Les œstrogènes placentaires ont pour rôle de maintenir le flux sanguin utéroplacentaire (Siiteri and MacDonald 1966). A l'inverse des autres organes stéroïdogènes, le placenta humain n'exprime pas les enzymes 17α-hydroxylase et 17,20 lyase qui permettent la conversion de la progestérone et la prégnénolone en androgènes (Figure 3). Afin d'assurer cette conversion, le placenta agit en coopération avec le fœtus. La prégnénolone placentaire est convertie en sulfate de prégnénolone puis en sulfate de déhydroépiandrostérone (DHA-S) par les glandes surrénales du fœtus. Ce DHA-S est ensuite métabolisé par le foie fœtal en 16α-OH DHA-S puis diffuse dans le placenta pour être aromatisé en œstrogènes ou est directement transféré vers le syncytium pour être métabolisé en androsténédione puis aromatisé en œstrogènes.

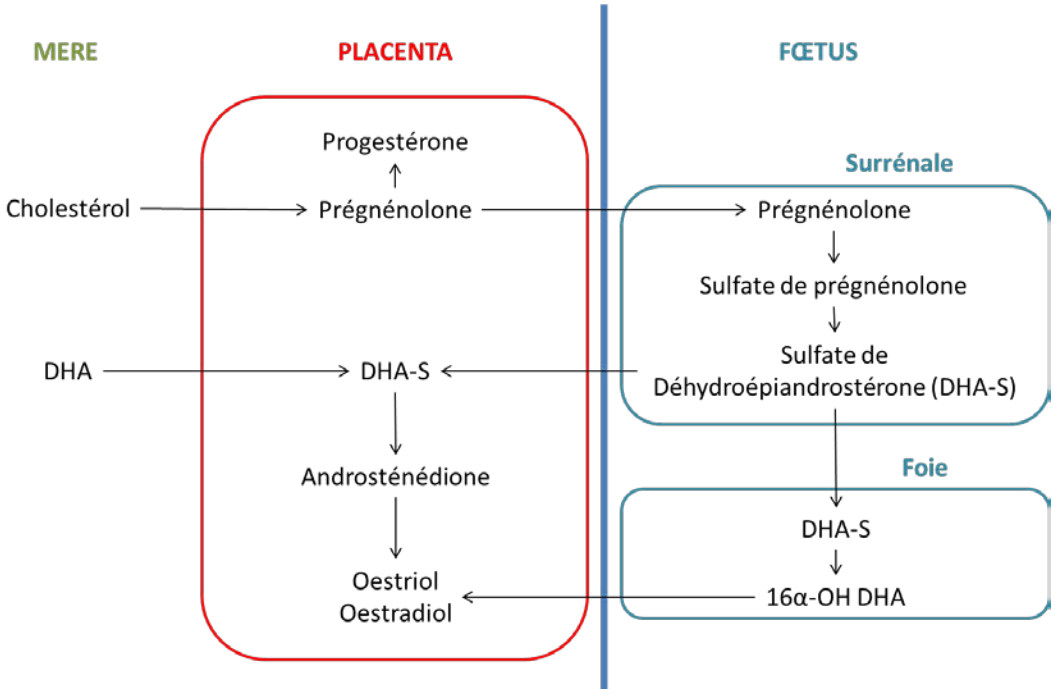


Figure 3 : Schéma de la synthèse des stéroïdes par le placenta et le fœtus

Le placenta sécrète également de nombreuses hormones peptidiques parmi lesquelles l'hormone chorionique gonadotrope (hCG), l'hormone placentaire lactogène (hPL) et la leptine, en moindre quantité. L'hCG est sécrétée durant toute la grossesse. Elle permet le maintien du corps jaune et le développement précoce du placenta. Toute altération de sa production aura des conséquences sur le déroulement de la grossesse. C'est une hormone pouvant être hautement glycosylée composée d'une sous unité α et d'une sous unité β. Les trophoblastes sécrètent également de l'hPL. Cette hormone est sécrétée tout au long de la grossesse dans le sang maternel où sa quantité ne cesse d'augmenter ; elle est le reflet de la masse syncytiale car sécrétée par les syncytiotrophoblastes.

1.1.2. Anatomopathologie du placenta

1.1.2.1. Anomalies génétiques et/ou chromosomiques

Il existe des anomalies à composantes génétique et chromosomique touchant le placenta qui peuvent avoir un impact important sur la grossesse et le développement du fœtus.

1.1.2.1.1. Retard de croissance intra-utérin

Le retard de croissance intra-utérin est une complication de la grossesse caractérisée par une croissance insuffisante du fœtus. Cette complication impactant 3 à 5% des grossesses peut être d'origine maternelle (prise de tabac, malformation de l'utérus), fœtale (anomalie chromosomique, malformation) ou placentaire (mauvaise vascularisation du placenta, infarctus placentaire, anomalie chromosomique). Les conséquences d'un retard de croissance intra-utérin sont variées, allant d'une atteinte des fonctions cérébrales à un risque de mortalité *in utero* ou à la naissance en passant par des maladies cardiovasculaires.

Une étude a montré qu'une expression altérée du gène PLAGL1 dans le placenta humain pouvait avoir un impact sur la croissance fœtale. En effet, en 2009, Diplas *et al.* ont mis en évidence que l'expression de PLAGL1 est diminuée en cas de retard de croissance intra-utérin (Diplas et al. 2009). Bien que ce gène soit soumis à empreinte maternelle et que cette

dernière soit normale, Iglesias-Platas*et al.* ont confirmé que ce facteur de transcription était moins exprimé dans le placenta de filles atteintes de retard de croissance intra-utérin comparativement à des placentas issus de grossesses normales (Iglesias-Platas et al. 2014). De plus, l'ARNm de NEAT1 a été montré comme étant surexprimé dans les cellules trophoblastiques et la longueur des télomères placentaires significativement diminuée en cas de retard de croissance intra-utérin (Gremlich et al. 2014; Toutain et al. 2013).

1.1.2.1.2. Prééclampsie

La prééclampsie, ou toxémie gravidique ou encore syndrome toxémique, est une pathologie de la grossesse spécifique de l'espèce humaine. Touchant environ 5% des femmes enceintes, elle correspond à un dysfonctionnement placentaire et affecte principalement les jeunes primipares et les multipares âgées, avec un risque plus élevé pour les jeunes primipares. Le risque de prééclampsie est plus élevé chez les filles de mères ayant elles-mêmes souffert de prééclampsie (Cooper et al. 1988). Cette pathologie augmente le risque de prématurité, de mort néonatale liée à cette prématurité et de mort *in utero* causée par une insuffisance placentaire chronique entre autres. Au niveau du placenta, elle entraine une hypotrophie ainsi qu'un infarctus placentaires faisant suite à une hypoxie prolongée.

La majorité de la littérature désigne la mère comme étant à l'origine d'une prédisposition génétique à la prééclampsie. Cependant, des études récentes ont également montré une participation paternelle. En effet, des études cliniques ont montré que des pères issus de grossesses prééclamptiques sont susceptibles d'induire des grossesses prééclamptiques chez leur partenaire (Esplin et al. 2001).

1.1.2.1.3. Hyperplasie trophoblastique des villosités

L'hyperplasie trophoblastique des villosités, ou môle hydatiforme, est une anomalie rare de la grossesse, touchant de 1 à 3 grossesses sur 1000 (Sebire and Seckl 2008). Cette pathologie est définie par une prolifération excessive des cellules trophoblastiques. On distingue les môles hydatiformes complètes, sans embryon, des môles hydatiformes partielles, qui sont triploïdes et pour lesquelles l'embryon est présent mais non viable. Les môles peuvent dans 10% des cas suivre une dégénérescence cancéreuse et ainsi devenir des

môles hydatiformes invasives ou choriocarcinomes (Sebire and Seckl 2008). Les môles touchent principalement la femme jeune et la femme âgée (Sebire et al. 2002).

Différentes mutations du gène NALP7/NRLP7 localisé sur le chromosome 19 ont été reportées dans certains cas de grossesses molaires à répétition, de même que des mutations du gène KHDC3L/C6orf221 (Murdoch et al. 2006; Parry et al. 2011; Ulker et al. 2013).

1.1.2.1.4. Anomalies chromosomiques limitées au placenta

Les anomalies chromosomiques limitées au placenta (ACLP) sont définies comme étant des anomalies chromosomiques présentes au niveau des tissus extra-embryonnaires et absentes des tissus fœtaux (Kalousek and Dill 1983). Les anomalies chromosomiques limitées au placenta sont dites limitées au placenta car le caryotype du placenta est différent de celui du fœtus. Elles sont classées selon 3 types : de type 1 lorsque les anomalies sont présentes dans le mésenchyme villositaire, de type 2 dans les cytotrophoblastes de la villosité, ou de type 3 si les anomalies sont présentes dans les deux (Figure 4). Les anomalies chromosomiques limitées au placenta sont la conséquence d'un accident post-zygotique (Wolstenholme 1996) ; il ne semble donc pas exister de gène de susceptibilité à cette pathologie. Cet accident peut être dû à un œuf euploïde (46 chromosomes) dont les cellules deviennent aneuploïdes (plus ou moins de 46 chromosomes) après un accident mitotique mais également à un œuf aneuploïde (47 chromosomes) qui redevient euploïde suite à un mécanisme de réparation mitotique tout en ayant gardé les 2 chromosomes de la paire trisomique d'un même parent.

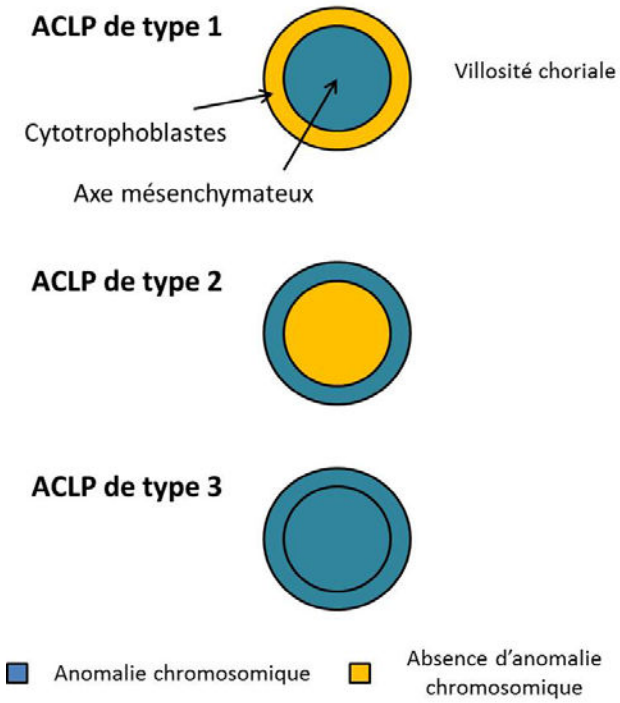


Figure 4. Illustration des différents types d'anomalies chromosomiques limitées au placenta *(d'après Toutain (Toutain 2012))*

1.1.2.2. Facteurs environnementaux

1.1.2.2.1. Infections bactériennes et virales

Certains pathogènes peuvent atteindre le placenta et ainsi perturber le déroulement de la grossesse. C'est le cas notamment du protozoaire *Toxoplasma gondii*, à l'origine de la toxoplasmose. Une infection par ce parasite est généralement bénigne et asymptomatique hors grossesse. Cependant, des complications peuvent apparaitre chez la femme enceinte non immunisée. En effet, la toxoplasmose peut être transmise de la mère au fœtus, c'est ce que l'on nomme toxoplasmose congénitale, et ainsi entraîner des complications dépendantes du stade de la grossesse au moment de la contamination. En début de grossesse, le risque de passage transplacentaire du parasite est faible, de l'ordre de 6%, mais les conséquences d'un tel passage sont graves, pouvant entraîner des séquelles neurologiques sur l'enfant voire même la mort du fœtus *in utero*. En fin de grossesse, le passage transplacentaire est plus élevé, d'environ 80%, mais les conséquences sont moins graves, induisant par exemple des lésions oculaires telles que la rétinochoroïdite (Desmonts

and Couvreur 1986; Dunn et al. 1999). Du point de vue du placenta, les trophoblastes extravilleux ancrés dans la décidue maternelle semblent plus vulnérables au virus que les syncytiotrophoblastes (Robbins et al. 2012).

Le virus de la rubéole est également un pathogène pouvant traverser la barrière placentaire. Comme la toxoplasmose, la rubéole est bénigne hors grossesse et passe parfois inaperçue. Là encore, la femme enceinte est une personne à risque car le virus peut atteindre le placenta puis le fœtus. Les conséquences d'une rubéole congénitale sont variables selon le moment de la grossesse auquel la contamination a lieu. Elle est d'autant plus grave qu'elle survient tôt. Avant le premier mois, elle peut être responsable de fausse couche tandis que plus tard, elle peut être la cause de retard de croissance, atteintes oculaires, malformations cardiaques ou atteintes neurologiques.

Le cytomégalovirus peut lui aussi atteindre le placenta. Une contamination par ce virus est souvent asymptomatique et bénigne mais une infection de la femme enceinte peut avoir des conséquences plus ou moins graves sur le fœtus : RCIU, atteintes neurologiques, hépatique, thrombopénie. Il s'agit de l'infection fœtale congénitale la plus fréquente dans les pays industrialisés. Les villosités choriales baignant les lacunes de sang maternel, elles peuvent être en contact direct avec le virus. Une étude menée par Pereira *et al.* a montré que les cellules placentaires étaient un réservoir de réplication du cytomegalovirus (Pereira et al. 2003). Plus précisément, les syncytiotrophoblastes ne semblent pas être infectés par le cytomegalovirus, à l'inverse des cytotrophoblastes présents dans les villosités ainsi que les cytotrophoblastes extravilleux (Fisher et al. 2000).

1.1.2.2.2. Perturbations endocriniennes

1.1.2.2.2.1. Définition

Certaines substances étrangères à l'organisme sont regroupées sous le terme de perturbateur endocrinien (PE). Le colloque de Weybridge au Royaume-Uni, organisé en 1996 par la Commission Européenne, l'Organisation pour la Coopération et le Développement Economique, l'Organisation Mondiale de la Santé et l'Industrie Chimique Européenne, a permis de dresser une première définition du terme PE : il s'agit d'une « substance étrangère à l'organisme qui produit des effets délétères sur l'organisme ou sa descendance, à la suite

d'une modification de la fonction hormonale » (European Comission 1996). En 2002, cette définition est affinée suite au Programme International sur la Sécurité Chimique de l'Organisation Mondiale de la Santé qui décrit les PE comme étant « une substance ou un mélange exogène altérant une ou plusieurs fonctions du système endocrinien et provoquant de ce fait des effets néfastes sur la santé de l'organisme intact ou sur celle de sa descendance ». Cette définition fait aujourd'hui l'objet d'un consensus international.

1.1.2.2.2.2. Prise de conscience et programmes de recherche

Une crise sanitaire est à l'origine de la notion de perturbation endocrinienne chez l'Homme. Durant les années 40-50, une hormone de synthèse à très fort pouvoir oestrogénique est commercialisée sous le nom de diethylstilbestrol, ou Distilbène® (Figure 5). Ce médicament est prescrit aux femmes enceintes en vue d'éviter les avortements spontanés, les risques de prématurité et les hémorragies gravidiques. Le diethylstilbestrol a été synthétisé en 1938 et est connu pour ses propriétés oestrogéniques puissantes. Plusieurs décennies après sa mise sur le marché, des anomalies génitales ont été rapportées chez les enfants de mères ayant pris du Distilbène® durant leur grossesse. En effets, des cas d'hypotrophie testiculaire, hypospadias (ouverture de l'urètre sur la face inférieure du pénis) ou cryptorchidie (absence de descente d'un ou des deux testicules dans le scrotum) ont été détectés chez les petits garçons exposés *in utero* tandis que les petites filles présentaient des malformations du vagin ou de l'utérus (Henderson et al. 1976; Palmer et al. 2009; Stillman 1982). De plus, des formes inhabituelles de cancer de l'utérus, du vagin et du sein à la puberté sont également observées chez ces filles. Actuellement, les effets du Distilbène® sont encore visibles après plusieurs générations. En effet, les enfants de la troisième génération, c'est-à-dire les petits-enfants de femmes exposés *in utero*, présentent plus d'hypospadias que les petits enfants de femmes non exposées (Kalfa et al. 2011; Klip et al. 2002; Pons et al. 2005). Suite à ces anomalies et pathologies rapportées, la commercialisation du Distilbène® a été totalement interdite en France en 1977. La majorité des effets observés suite à une exposition au diethylstilbestrol touchant le système reproducteur ou conduisant à un cancer hormonodépendant, la notion de perturbation hormonale et donc de PE est née.

Lors de l'accident de Seveso en Italie en 1976, la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD, Figure 5) a été relarguée dans l'environnement après l'explosion d'une usine de pesticides. Cette dioxine TCDD, ou dioxine Seveso, est classée cancérogène de groupe 1 par le Centre International de Recherche sur le Cancer, c'est-à-dire agent cancérogène certain pour l'Homme. L'apparition de cancers chez les personnes exposées à cette dioxine lors de l'accident a été étudiée. Il en est ressorti que la fréquence globale des cancers chez la femme et en particulier les cancers du sein et les lymphomes malins non hodgkiniens était accrue comparativement aux femmes non exposées à cet accident (Pesatori et al. 2009; Warner et al. 2011). Chez les hommes, les études ont détecté un excès de risque de myélome multiple. En plus des effets cancérogènes observés après une forte exposition au TCDD, des études ont permis de mettre en évidence que cette dioxine était également un PE à des concentrations plus faibles. Cette molécule exerce des effets œstrogéniques et anti-œstrogéniques (Boverhof et al. 2006; Buchanan et al. 2000; Devito et al. 1992; Knerr and Schrenk 2006; Ndebele et al. 2010; Rogers and Denison 2002; Tanaka et al. 2007). Ces perturbations endocriniennes observées principalement *in vitro* pourraient d'ailleurs être une des causes du développement des cancers observés chez les personnes après exposition au TCDD.

Suite à ces crises sanitaires majeures, les études sur les PE se sont développées.

Nous pouvons également citer le bisphénol A comme autre cas de prise de conscience plus récent. En effet, le bisphénol A (Figure 5) est une molécule découverte en 1936 ayant des effets oestrogéniques faibles. A l'origine, le bisphénol A devait être commercialisé pour son activité oestrogénique mais la synthèse deux ans plus tard du diethylstilbestrol, possédant une activité plus forte a changé les applications d'utilisation du bisphénol A. Il a donc été largement commercialisé pendant près de 80 ans pour des propriétés autres que son effet oestrogénique et utilisé afin de recouvrir l'intérieur de certaines boîtes de conserves ou canettes mais aussi en tant que révélateur de la coloration à l'impression dans les tickets de caisse et en tant que plastifiant dans les biberons entre autres. Il n'a d'ailleurs été interdit par le sénat français dans les biberons qu'en 2010 suite à différentes données le classant comme PE. De plus, l'Agence Nationale de SEcurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) recommande également depuis septembre 2011 de

limiter l'exposition de la population en le substituant dans les matériaux en contact avec les denrées alimentaires. Selon l'ANSES, il existe des effets avérés sur la reproduction, le métabolisme et le comportement chez l'animal mais aussi à des effets suspectés sur la reproduction, le métabolisme et des pathologies cardiovasculaires chez l'homme suite à une exposition au bisphénol A (ANSES 2011).

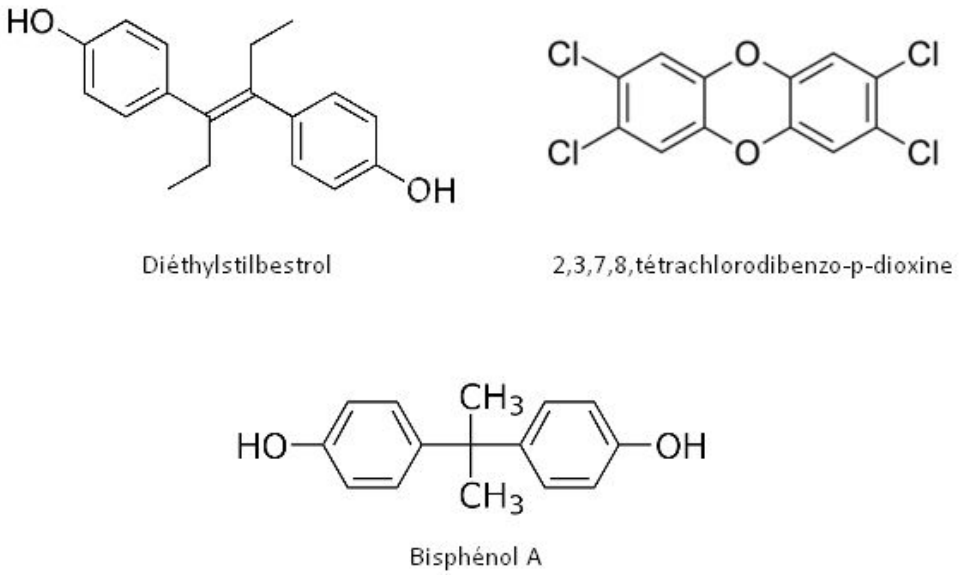


Figure 5. Formules chimiques de divers perturbateurs endocriniens : diethylstilbestrol, 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine et bisphénol A

Par la suite, l'évaluation du risque lié aux produits chimiques ayant un effet PE a suscité un intérêt d'envergure internationale. Dans ce cadre, l'agence américaine de protection de l'environnement (United States Environmental Protection Agency, US EPA) a développé un programme de recherche sur les PE afin d'améliorer leur identification et l'évaluation de leurs effets : l'*Endocrine Disruptor Screening Program*. Ce programme a permis de dresser en avril 2009 une liste de 134 substances jugées prioritaires à étudier avec une batterie de tests *in vitro* et *in vivo* regroupés sous le terme de TIER 1 comprenant des solvants, plastiques, molécules contenues dans des soins corporels… Une liste révisée a été publiée en 2010 ; celle-ci comporte 109 produits chimiques qui sont soit des ingrédients actifs de pesticide, soit des molécules retrouvées dans les eaux de boissons, soit les deux. Parmi ces produits à évaluer, le benzo[a]pyrène (BaP) et le di-2-éthylhexyle phtalate (DEHP) sont retrouvés dans

les eaux de boisson et font partie des substances à étudier. Nous nous intéresserons plus particulièrement à ces deux molécules par la suite.

En Europe, dans le cadre de la stratégie communautaire relative aux PE, une liste de 428 substances prioritaires susceptibles de perturber le système endocrinien humain a été établie par la Commission Européenne en 2007.

En France, le Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens a été lancé en 2005 par le ministère de l'écologie et du développement durable. Il a pour objectifs de soutenir la recherche fondamentale et appliquée concernant le devenir des PE dans l'organisme et l'environnement, favoriser la compréhension de leurs effets sanitaires mais également d'identifier les dangers et évaluer les risques liés à une exposition à ces molécules. Les thèmes de recherche actuels de ce projet sont l'étude des mécanismes d'action de la perturbation endocrinienne, les effets des mélanges de substances à faible dose mais aussi la modélisation et la détermination des expositions.

De plus, le sénat français s'intéresse également à cette problématique et a voté une loi en 2012 interdisant l'utilisation du bisphénol A et autres PE et substances cancérogènes dans les dispositifs médicaux destinés aux bébés et femmes enceintes (Loi 2012-1442).

1.1.2.2.2.3. Origine des PE, classification et exemples

Les PE sont structurellement de classe diverse et appartiennent à différentes familles de substances chimiques : esters de phtalates, phytœstrogènes, dioxines, pesticides, métaux lourds, composés bromés...

Les PE peuvent être naturels, produits par le corps humain (hormones humaines telles que l'hormone thyroïdienne, la testostérone, l'insuline ou les œstrogènes comme l'œstradiol, l'oestriol et l'œstrone) ou par les plantes (phyto-œstrogènes tels que les isoflavones de soja). Les PE peuvent également être synthétiques, produits pour leur effet hormonal (éthinylœstradiol présent dans les pilules contraceptives) ou des substances chimiques employées dans l'industrie, l'agriculture et les biens de consommation ou utilisés comme sous-produits mais dont l'effet sur les hormones n'est pas intentionnel. Cette dernière catégorie est sujette à controverse et regroupe entre autres les pesticides tels que

le dichlorodiphényltrichloroéthane, les médicaments ou les plastifiants que l'on retrouve quasiment partout tels que les esters de phtalates.

En 2002, la commission européenne a déterminé une classification pour les PE (tableau 1).

Catégorie 1	PE avéré	Preuves de l'existence d'effet perturbateur du système endocrinien i*n vivo* dans au moins une étude publiée. Cette catégorie comprend également les substances pour lesquelles il n'existe pas suffisamment de preuves mais sont liées aux substances de cette catégorie du point de vue chimique.
Catégorie 2	PE potentiel	Les données *in vitro* indiquent une perturbation endocrinienne possible dans les organismes intacts. De plus, cette catégorie inclut également les effets *in vivo* susceptibles ou non d'être dus à des PE. Cette catégorie peut aussi inclure des analyses structurelles ou des considérations métaboliques.
Catégorie 3a	Aucune base scientifique ne justifie leur inclusion dans la liste	Les études sur les effets PE sont disponibles mais ne donnent pas réellement d'indication sur ce type d'effet.
Catégorie 3b	Données inexistantes ou insuffisantes	

Tableau 1.Tableau de classification des PE, *d'après la classification de la Commission Européenne de 2002*

Parmi les PE confirmés ou potentiels, nous retrouvons le bisphénol A, le diethylstilbestrol et les dioxines, dont la dioxine Seveso, mais également des parabènes, des métaux lourds tels que le cadmium et l'arsenic, des substances présentes dans les pesticides telles que le dichlorodiphényltrichloroéthane, des médicaments (vinclozoline), des phytoestrogènes (isoflavones) (Barbier 2011a).

Actuellement, le DEHP, qui est un produit chimique produit en grand volume, est classé en catégorie 1, c'est-à-dire PE avéré, par le comité d'experts de la communauté européenne statuant sur les PE (annexes 1 et 15 du rapport final de la commission européenne) (European Comission 2014b). Le BaP, considéré comme produit chimique persistant, est quant à lui classé en catégorie 3 mais apparait tout de même sur la liste des produits chimiques à suivre. En effet, certaines études montrent des effets de perturbation endocrinienne du BaP tandis que d'autres études ne montrent aucune conséquence.

1.1.2.2.2.4. Conséquences cliniques d'une exposition aux PE

Les PE ont différentes conséquences sur l'organisme, comme l'ont montré les différentes crises sanitaires citées précédemment. Les altérations de la santé les plus fréquences sont des modifications du système reproducteur mâle mais aussi femelle. Ces altérations comprennent entre autres des problèmes d'infertilité, un inversement du sex ratio (diminution du nombre de naissance de garçons par rapport aux filles), des malformations du système reproducteur telles que la cryptorchidie ou l'hypospadias et une puberté précoce des enfants exposés (Agopian et al. 2013; Balabanic et al. 2011). Les PE peuvent également perturber le déroulement de la grossesse, notamment en entraînant des fausses couches, comme c'est le cas avec le bisphénol A et le TCDD ou en perturbant le développement du fœtus (Lathi et al. 2014; Schnorr et al. 2001). Des cas de cancers hormonodépendants affectant le sein, la prostate et les testicules sont aussi régulièrement décrits comme pouvant être dus à des PE, de même que des problèmes neurologiques (Allen et al. 1997; Cocco 2002; Knower et al. 2014; Rezg et al. 2014). En ce qui concerne les troubles métaboliques tels que l'obésité ou le diabète, il semblerait exister un lien mais celui-ci n'est pas totalement avéré.

1.1.2.2.2.5. Mélange des PE ou effet cocktail

La toxicologie est traditionnellement fondée sur les travaux de Paracelse, médecin du 16ème siècle, qui a observé que « rien n'est poison, tout est poison : seule la dose fait le poison ». D'après cette maxime, il est généralement admis que plus la dose d'une molécule ou substance est élevée, plus elle aura un effet toxique. Cette relation de dose-effet conduit donc logiquement à une progression linéaire. Cependant, cet adage ne peut pas s'appliquer

aux PE car ils ont la particularité d'avoir une action à très faible dose, inférieure à celles qui inquiètent habituellement les toxicologues (Nagel et al. 1997). De plus, plusieurs PE pris simultanément peuvent n'avoir aucun effet en eux-mêmes à faible dose sur une cellule ou un organisme mais devenir toxiques en combinaison avec d'autres PE auxquels l'organisme est exposé simultanément (Christiansen et al. 2009; Kortenkamp 2007). Cet effet cocktail est donc la conséquence d'effets additifs, synergiques ou antagonistes et ajoute un degré de complexité à la compréhension des mécanismes mis en jeu par les PE et leurs conséquences. Si un organisme est contaminé par plusieurs molécules à des doses sans effet pour chaque molécule prise séparément et que leur cible est la même, les conséquences de cette multi exposition seront très importantes et difficilement prédictibles. Il est donc très difficile d'évaluer l'impact d'une telle substance sur un organisme.

Il est également important de noter qu'en plus de la diversité de propriétés physico-chimiques des PE, il n'existe pas toujours de corrélation entre les effets exercés par un produit chimique et sa structure. Cette observation pourrait être due à une compréhension encore insuffisante des mécanismes d'actions des PE.

Le problème posé par les PE et leur effet à faible dose ainsi que la problématique de la multi-exposition est soulevé dans deux saisines publiées par l'ANSES en 2011 et 2012 (2011-SA-0237 et 2012-SA-0033) en se basant sur des résultats démontrés par le programme de recherche européen Cluster of Research on Endocrine Disruption in Europe. Ces avis mettent en avant que la relation dose-réponse des PE n'est pas linéaire mais en forme de « U » ou de « U inversé » et que les approches conventionnelles ne semblent pas être adaptées à leur évaluation. Pour toutes ces raisons, il semble donc difficile de se prononcer de manière générale sur la détermination d'une dose d'effet seuil pertinente d'un PE en particulier.

Certains PE tels que le triclosan retrouvé dans les pesticides, ou le bisphénol A, peuvent se bioaccumuler au sein d'un organisme, ce qui a pour conséquence de les retrouver à des concentrations non négligeables (Chen et al. 2014; Kookana et al. 2013; Liu et al. 2011).Ces différentes notions rendent beaucoup plus difficile l'extrapolation des études *in vitro* à *in vivo* puis de l'*in vivo* aux données expérimentales qui représentent une multi exposition réelle.

Lorsque l'on veut étudier les effets des PE chez l'Homme, il faut donc prendre en compte l'exposition de la population, ce qui inclut ses interactions avec l'environnement. Il est admis en toxicologie que le risque est dépendant de l'exposition et du danger. L'exposition est difficilement estimable en ce qui concerne les PE du fait de sa bioaccumulation, des expositions multiples et de l'effet cocktail entre autres. Il est donc nécessaire d'évaluer le danger afin de limiter le risque dans la population générale. Or, pour étudier le danger, il est nécessaire de mettre au point des biomarqueurs permettant d'évaluer les effets biologiques de PE.

1.1.2.2.2.6. Fenêtre d'exposition aux PE

La notion de fenêtre d'exposition correspond aux périodes de la vie qui sont considérées comme importantes et pour lesquelles une exposition aux PE peut avoir de graves conséquences. Les périodes de la vie les plus sensibles à une telle exposition sont la vie fœtale et la petite enfance. Une exposition *in utero* aux PE peut avoir de graves conséquences comme nous l'avons vu avec le cas du diethylstilbestrol prescrit aux femmes enceintes et ses effets dépendent du stade de développement en cours au moment de la contamination. Il parait intuitif que les fœtus soient particulièrement sensibles aux PE car leurs mécanismes de régulations ne sont pas encore assez développés pour compenser une telle exposition. En ce qui concerne la petite enfance, un enfant impubère apparait comme beaucoup plus sensible aux PE qu'un adulte ayant déjà terminé sa puberté et possédant déjà les mécanismes de régulation du système hormonal. La période fœtale et la petite enfance étant particulièrement sensibles à une exposition aux PE, les femmes enceintes et les jeunes enfants ont besoin d'une attention particulière à propos de l'évaluation du risque et de normes particulières afin de limiter leur exposition.

Dans ce cadre, l'ANSES définit dans la saisine 2011-SA-02-37 du 7 juillet 2011 qu'il est urgent d'agir pour limiter l'exposition de la population, et notamment des populations sensibles telles que les femmes enceintes et les jeunes enfants afin de réduire les conséquences sanitaires, environnementales, économiques et sociales des PE.

1.1.2.2.2.7. Mécanismes d'action

Les PE exercent leurs effets adverses en interférant avec le système endocrinien. Les PE perturbent les mécanismes de signalisation, de régulation et d'action physiologiques. Pour cela, ils exercent leur action à différents niveaux : ils peuvent mimer des hormones ou bloquer leur effet, ce qui sont les cas les plus décrits car connus depuis longtemps, mais ils peuvent aussi perturber la synthèse, le stockage, la libération, la sécrétion, le transport ou l'élimination des hormones (INSERM 2008; Swedenborg et al. 2009).

Afin de moduler le système endocrinien, les PE agissent soit sur des voies médiées par des récepteurs nucléaires tels que les récepteurs aux hormones stéroïdes (androgènes, œstrogènes) ou à l'hormone thyroïdienne, soit par des voies n'impliquant pas de récepteur. La grande majorité des études actuelles porte sur la mécanistique impliquant les récepteurs et il en ressort que, dans la plupart des cas, les PE ont le rôle d'agoniste ou d'antagoniste sur ces récepteurs plutôt qu'une action de séquestration des hormones.

1.1.2.2.2.7.1. Mécanismes impliquant des récepteurs : « voie génomique » et « voie rapide »

Les mécanismes impliquant les récepteurs sont les voies les mieux décrites. Les récepteurs nucléaires les plus connus pour être modulés par les PE sont les récepteurs nucléaires aux stéroïdes, c'est-à-dire aux œstrogènes et aux androgènes. Il existe deux types de récepteurs aux œstrogènes ER (pour *Estrogen Receptor*), ERα et ERβ, qui lient naturellement les hormones oestrogéniques, c'est-à-dire l'œstradiol, l'œstrone et l'œstriol (Green et al. 1986; Mosselman et al. 1996; Nagel et al. 1997). En ce qui concerne les PE, différentes études ont mis en évidence que les phtalates par exemple se lient préférentiellement à ERα tandis que les phytoestrogènes lient ERβ (Boonchird et al. 2010; Cvoro et al. 2007). Concernant le récepteur aux androgènes AR (pour *Androgen Receptor*), il lie naturellement la testostérone mais aussi la dihydroxytestostérone et l'androstenedione. Lorsque l'hormone stéroïdienne entre dans la cellule, elle se fixe à son récepteur. Le récepteur se dimérise ensuite et s'associe à des cofacteurs pour se fixer à son élément de réponse sur l'ADN (respectivement ERE, *Estrogen Response Element*, et ARE, *Androgen Response Element*, pour ER et AR) et induire l'expression ou la répression de gènes cible

(Figure 6, partie gauche). La réponse biologique induite par cette voie d'activation dite « génomique » varie de l'ordre de la minute à quelques heures voire quelques jours (Norman et al. 2004). En revanche, il existe une autre voie d'activation dite « rapide » qui induit des réponses en quelques secondes voire quelques minutes Cette voie fait intervenir des récepteurs non classiques aux hormones stéroïdiennes associés à la membrane plasmique. Après liaison de l'hormone sur ces récepteurs, des voies de signalisations impliquant des seconds messagers tels que l'AMPc, le calcium ou l'activation de MAP kinases sont déclenchées (Figure 6, partie droite) (Losel et al. 2003; Nemere et al. 2003).

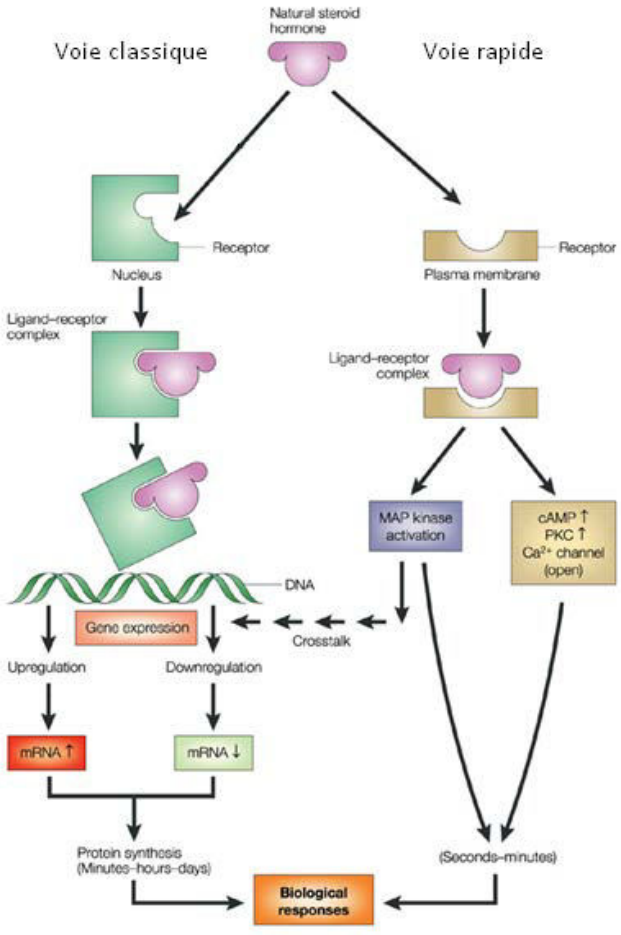


Figure 6.Voies de signalisation impliquant des récepteurs : voie « génomique classique » à gauche et voie « rapide » à droite *(D'après Norman et al., 2004)*

La liaison d'un ligand sur un récepteur peut induire une réponse, c'est le cas des agonistes, qui peuvent être soit un ligand naturel du récepteur soit une molécule mimant ce ligand naturel, ou bloquer l'action du ligand naturel (antagoniste). Les récepteurs peuvent donc être activés ou inactivés par des molécules endogènes comme les hormones ou exogènes telles que les médicaments et les polluants. La majorité de l'action des PE passe par la liaison aux récepteurs nucléaires, notamment ER et AR mais aussi au récepteur à l'hormone thyroïdienne ou encore au récepteur PPARγ (Casals-Casas et al. 2008; Guo and Zhou 2013; Hu et al. 2012; Juberg et al. 2013). Une activation de ce dernier pourrait d'ailleurs avoir un impact dans de potentiels troubles métaboliques.

1.1.2.2.2.7.2. Mécanismes n'impliquant pas de récepteurs

En plus de pouvoir se lier aux récepteurs, les PE peuvent exercer leurs effets adverses en perturbant la synthèse ou le transport des hormones. C'est le cas par exemple du dichlorodiphényltrichloroéthane qui cible une enzyme de métabolisation des hormones stéroïdiennes, le cytochrome P450 aromatase ou CYP19 qui convertit les androgènes en œstrogènes (Cheshenko et al. 2008). Ce cytochrome est actuellement le plus étudié dans les études menées sur les PE et fait partie entre autres de la batterie de test de screening du programme de criblage de PE de l'United State Environmental Protection Agency.

Un autre mode de perturbation endocrinienne est le ciblage des protéines de transport des hormones dans le sang. En effet, les hormones n'agissent pas toujours sur leur lieu de synthèse. Par exemple, la sex hormone-binding globulin à forte affinité permet de transporter les hormones stéroïdes tandis que la transthyrétine transporte l'hormone thyroïdienne. Il a d'ailleurs été montré que les polychlorobiphényles prenaient la place de l'hormone thyroïdienne sur cette protéine de transport, perturbant ainsi son transport (Cheek et al. 1999; Lans et al. 1994; Rickenbacher et al. 1986)

1.1.2.2.2.8. Modèles d'étude des perturbateurs endocriniens in vitro

Depuis que l'évaluation des effets des PE est devenue une priorité d'envergure internationale, des modèles d'étude se sont développés, notamment les modèles *in vitro*, avec et sans cellules. Ces tests s'intéressent à différents aspects de la perturbation endocrinienne, de la liaison d'un PE aux récepteurs stéroïdiens à la prolifération sous

contrôle oestrogénique en passant par la synthèse d'hormone. Il existe un test biochimique *in vitro*, sans cellules et donc peu coûteux, qui permet d'évaluer l'affinité d'une molécule pour un récepteur (de Jong et al. 2005). Ce test évalue la liaison d'une molécule aux récepteurs stéroïdiens ER et AR (Ohno et al. 2002). Les récepteurs peuvent être naturels, obtenus à partir d'extraits cellulaires, ou recombinants, obtenus à partir de bactéries (Helbo et al. 1994; Scippo et al. 2002; Scippo et al. 2004a). Le test de liaison ou « Binding Assay » a permis de montrer que de nombreux xénobiotiques ont la capacité de se fixer à ER et AR (Akahori et al. 2008). Il permet de mesurer une affinité relative d'une molécule étudiée par rapport à un ligand naturel, par exemple le 17-β œstradiol pour ER, mais pas de différencier un potentiel effet agoniste ou antagoniste. De plus, ces tests permettent d'étudier des effets PE sur les récepteurs ERα principalement mais pas sur les récepteurs ERβ, qui sont pourtant la cible d'extraits végétaux pouvant avoir un effet PE.

Afin d'étudier plus en détail les effets d'une substance, un test basé sur l'utilisation d'un gène rapporteur est également couramment utilisé. Il utilise des lignées cellulaires génétiquement modifiées exprimant un gène rapporteur, généralement la luciférase, sous le contrôle d'un élément de réponse au complexe ligand-récepteur (Figure 7). Lorsque le récepteur est activé par la liaison du ligand, il se fixe sur l'élément de réponse et induit l'expression de la luciférase. L'expression de ce rapporteur est ensuite évaluée par la mesure de la luminescence de la luciférase dans les extraits cellulaires totaux après ajout de substrats adéquats. Les molécules à effet agonistes augmentent le signal détecté tandis que les molécules antagonistes le diminuent. Cette technique permet de mettre en évidence un effet œstrogénique ou anti-œstrogénique mais aussi androgénique ou anti-androgénique selon le récepteur aux stéroïdes utilisé et l'élément de réponse. Il évalue également d'éventuels effets synergiques d'un mélange de substances en comparant l'activité du mélange à celle de chaque composant pris séparément (Scippo and Maghuin-Rogister 2007). Ce test est largement utilisé à l'heure actuelle pour étudier les hormones stéroïdes et les dioxines entre autres (Scippo et al. 2004b; Scippo et al. 2006; Willemsen et al. 2002; Willemsen et al. 2004).

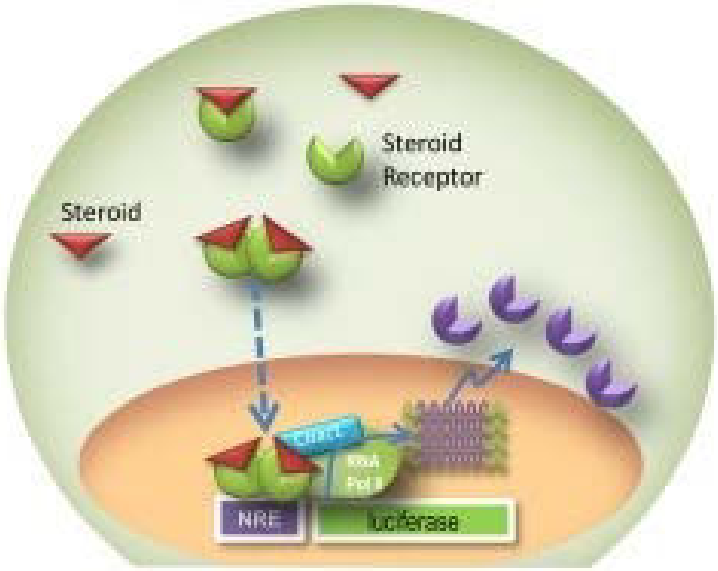


Figure 7. Schéma représentant le principe de la technique du gène rapporteur *(Paguio et al. 2010)***.**

Le test Yeast Estrogen Screen, ou test YES, est également un test largement utilisé pour déterminer les effets œstrogéniques ou anti-œstrogéniques de molécules. Le principe de ce test est basé sur la technique du gène rapporteur, tout comme le test précédent. Cependant, le modèle est différent car le test fait intervenir un autre modèle biologique : la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Dans ce cas, la levure est génétiquement modifiée pour exprimer le récepteur humain aux œstrogènes et est transfectée par un plasmide contenant le gène codant pour LacZ sous le contrôle d'un promoteur et de l'élément de réponse aux œstrogènes ERE. Selon un mécanisme similaire au test précédent, la fixation d'une molécule à effet oestrogénique sur l'ER humain exprimé par la levure entraîne la transcription du gène rapporteur LacZ qui code la β-galactosidase (Figure 8). Cette protéine est une enzyme catalysant une réaction colorimétrique après ajout de substrat adéquat dont le changement de couleur peut être mesuré et est dépendant de l'activité œstrogénique de la molécule testée. Ce test permet donc de mettre en évidence aussi bien des effets œstrogéniques qu'anti-œstrogéniques et est utilisé pour tester les effets PE de diverses substances ou mélanges : parabènes, bisphénol A, genistéine, phtalates (Bazin et al. 2013; Dhooge et al. 2006; Ramireza et al. 2014). De plus, le même principe de test est utilisé afin de mettre en

évidence les propriétés androgéniques ou anti-androgéniques de substances par le test Yeast Androgen Screen YAS dans lequel la levure exprime l'AR humain (Fang et al. 2012; Ma et al. 2014).

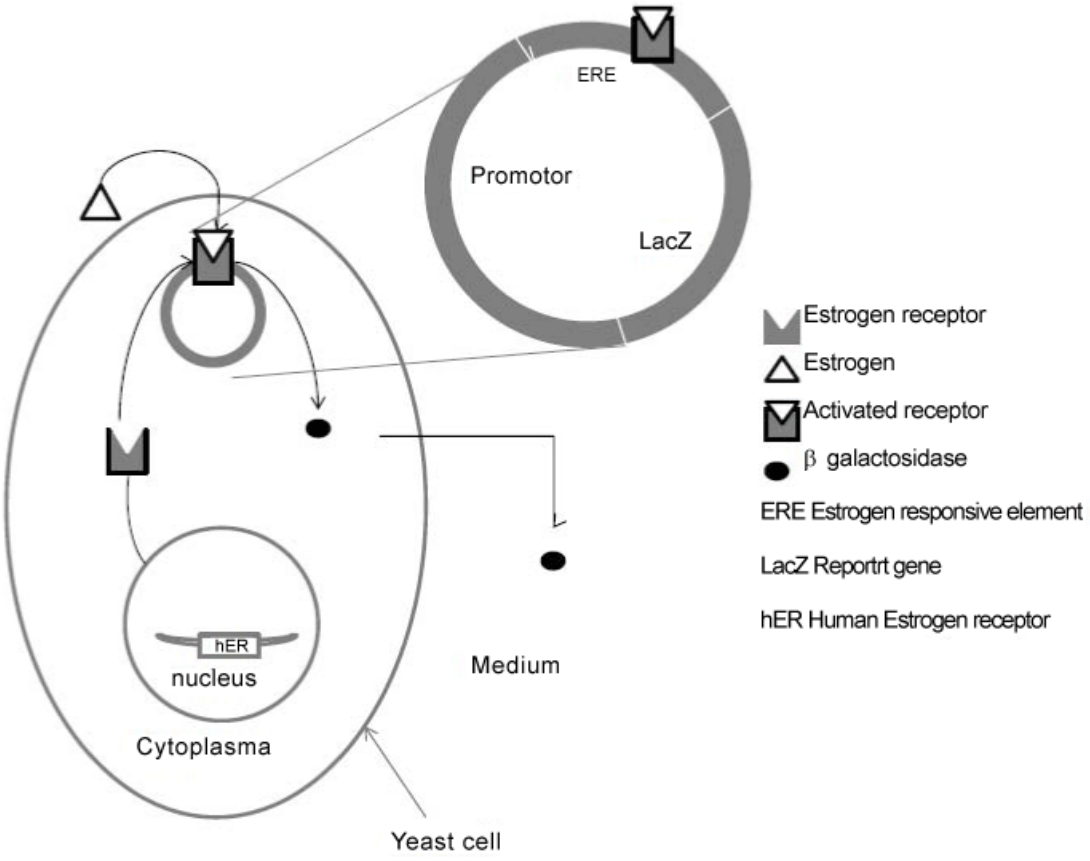


Figure 8. Schéma représentant le principe du test YES *(Bazin et al. 2013)*.

Un autre type de test utilisé pour détecter un effet œstrogénique ou anti-œstrogénique est le test E-screen. Ce test est basé sur la capacité de prolifération des cellules MCF-7, une lignée de cellules de cancer du sein qui possède la propriété de proliférer sous l'action d'œstrogènes naturels (Soto et al. 1992; Villalobos et al. 1995). Lorsque les cellules sont incubées avec un PE ayant un effet oestrogénique tel que le bisphénol A ou le diethylstilbestrol, les cellules de la lignée MCF-7 tendent à proliférer plus qu'en absence de PE (Folmar et al. 2002; Schafer et al. 1999).

L'étape finale de la biosynthèse des œstrogènes fait intervenir le cytochrome P450 aromatase, codé par le gène *CYP19*, pour convertir de manière irréversible les androgènes en œstrogènes. Il s'agit de l'enzyme qui a reçu le plus d'attention quant à sa modulation par les polluants environnementaux (Chen 2002). La modulation de l'expression et de la fonction de l'aromatase peut donc avoir des effets importants sur la reproduction, notamment en induisant des ovaires kystiques, un hypogonadisme ou une anomalie des spermatozoïdes voire une infertilité (Carani et al. 2002; Carani et al. 2005; Jones et al. 2007; O'Donnell et al. 2001; Simpson et al. 2002). Certains PE tels que les phytoestrogènes ou les fongicides peuvent affecter l'expression ou l'activité de l'aromatase (Edmunds et al. 2005; Quignot et al. 2012). Un test a donc été développé afin de détecter une interférence des PE avec l'activité de l'aromatase. Il s'agit d'utiliser des microsomes contenant l'aromatase recombinante humaine et le cytochrome P450 réductase. Ce test mesure la conversion des androgènes en œstrogènes dans les microsomes. Un substrat radioactif (^{3}H-androstenedione) et du NADPH sont ajoutés aux microsomes. De l'eau tritiée $^{3}H_2O$ est relarguée lors de la conversion de l'androstenedione en œstrone et est directement reliée à l'activité de l'aromatase (UnitedStatesEnvironmentalProtectionAgency 2009). Du fait des contraintes liées à l'obtention d'autorisation nécessaires pour la manipulation de la radioactivité, ce test ne peut pas être réalisé par tous les laboratoires.

Il existe un autre test permettant d'évaluer la stéroïdogenèse. Ce test utilise la lignée cellulaire humaine rénale H295 qui exprime toutes les enzymes clés de la stéroïdogenèse et consiste en le dosage des hormones stéroïdes, œstradiol et testostérone (Gracia et al. 2006; Hecker et al. 2006; Hecker and Giesy 2008).

Les tests décrits ci-dessus sont utilisés dans les différents programmes de recherche dont le programme de recherche sur les PE Endocrine Disruptor Screening Program de l'US EPA. Ils servent actuellement à l'évaluation des substances présentes sur la liste TIER 1 de ce projet. Parmi ce panel de tests *in vitro*, il est à noter que les plus couramment utilisés s'intéressent à la liaison d'une substance sur un récepteur ou à son activité œstrogénique ou androgénique mais peu de tests sont réalisés sur la sécrétion hormonale, qui est pourtant une étape importante dans les mécanismes de perturbation endocrinienne. Il parait donc important de compléter cet ensemble de tests d'évaluation du caractère PE de substances

par le développement de tests complémentaires *in vitro* sur cellules permettant le dosage des hormones non stéroïdiennes dans le milieu extracellulaire.

1.1.3. Modèles d'étude du placenta humain

Le placenta discoïde, hémochorial et décidual, est spécifique de l'espèce humaine, des singes et des rongeurs (Leiser and Kaufmann 1994). Cependant, le placenta humain possède d'autres caractéristiques communes avec celui des singes mais différentes de celui des rongeurs et plus particulièrement du modèle murin tant du point de vue structural que fonctionnel. Parmi les différences notables, le placenta murin est hémotrichorial, c'est-à-dire que la circulation maternelle et la circulation fœtale sont séparées par deux couches de syncytium et une couche de cytotrophoblastes tandis que le placenta humain est hémomonochorial, c'est-à-dire qu'à terme les deux circulations sont séparées par une couche unique de syncytium (Rossant and Cross 2001). De plus, le placenta des rongeurs possède un seul cotylédon, la structure regroupant les villosités, alors que le placenta humain est multicotylédonnaire, et la surface d'échange entre les circulations maternelle et fœtale est beaucoup plus développée chez l'homme que chez le rongeur grâce à des villosités plus arborisées et la présence de microvillosités à la surface des cellules du syncytium. Le rongeur n'est donc pas un bon modèle d'étude du placenta humain ; quant au singe, son utilisation en laboratoire est très réglementée et restreinte pour des raisons éthiques et économiques. Le placenta humain est un organe difficile à obtenir pour réaliser des études expérimentales pour d'évidentes raisons éthiques. C'est pourquoi des modèles *in vitro* ont été mis au point.

1.1.3.1. Culture d'explants villositaires

La culture d'explants consiste à obtenir des fragments de 1 à 2 mm^3 à partir d'une villosité choriale. Les fragments ainsi obtenus sont soit mis en culture sur une matrice de Matrigel, de collagène de type I ou au contact d'un fragment de décidue, soit incubés dans des milieux physiologiques ou des milieux de culture. Dans ce dernier cas, l'intégrité de la villosité est rapidement altérée. Lorsque la villosité est incubée sur une matrice ou avec un fragment de décidue, l'explant est viable plus longtemps. Des cellules de type épithélial apparaissent à l'extrémité de la villosité et expriment les marqueurs de trophoblastes

extravilleux décrits *in situ* ; ce modèle permet donc d'étudier le comportement des cytotrophoblastes extravilleux dans un contexte relativement proche de la physiologie(Aplin et al. 1999).La technique de culture d'explants villositaires a tout d'abord été utilisée afin d'étudier différents aspects de l'interface fœto-maternelle : le transport placentaire, le métabolisme et la fonction endocrine du placenta(Miller et al. 2005). Plus récemment, cette technique a également été utilisée pour décrire les phénomènes de prolifération cellulaire et de différenciation au cours de la grossesse.

1.1.3.2. Culture primaire de trophoblastes

1.1.3.2.1. Cytotrophoblastes villeux

Les cytotrophoblastes villeux sont obtenus par digestions enzymatiques séquentielles des villosités placentaires. Cette technique a été mise au point à partir de placentas à terme et du deuxième trimestre (Alsat et al. 1991; Kliman et al. 1986). L'utilisation d'un gradient de Percoll permet de séparer les cellules en fonction de leur densité puis les cytotrophoblastes villeux sont ensemencés en boîtes de culture. Ils peuvent ensuite s'agréger dans les premières 24 heures puis fusionner afin de former des syncytiotrophoblastes. Le syncytium ainsi formé exprime des hormones spécifiques telles que l'hCG, l'hPL, la progestérone et l'œstradiol.

1.1.3.2.2. Cytotrophoblastes extravilleux

Les cytotrophoblastes extravilleux proviennent de villosités chorioniques crampon du premier trimestre préalablement disséquées. Après digestion enzymatique douce et séquentielle par de la trypsine et de la DNAse de type IV, les cellules des villosités sont séparées sur gradient de Percoll puis ensemencées en monocouche sur une matrice de Matrigel, laminine ou fibronectine (Cartwright et al. 2002; Harris et al. 2008; Tarrade et al. 2001). La digestion enzymatique pour récupérer les cytotrophoblastes extravilleux est plus douce que pour les cytotrophoblastes villeux (Tarrade et al. 2002). La pureté de la préparation dépendant de différents facteurs (origine, qualité, temps d'action des enzymes) une estimation du taux de contamination par des cellules mésenchymateuses est préconisée pour chaque préparation (Frank et al. 2000).

1.1.3.3. Les lignées cellulaires trophoblastiques

De nombreuses études ont été réalisées sur des lignées cellulaires trophoblastiques Elles représentent une approche plus facile d'accès pour mener des études de biologie cellulaire, fonctionnelle et d'endocrinologie.

1.1.3.3.1. Les lignées cellulaires tumorales

Les choriocarcinomes sont des tumeurs malignes d'origine trophoblastique comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre sur l'hyperplasie trophoblastique des villosités. Des lignées issues de choriocarcinomes ont été établies. Elles possèdent les caractéristiques de cellules trophoblastiques mais également une capacité proliférative accrue et sont couramment utilisées comme modèle d'étude des trophoblastes pour leur capacité endocrine.

Différentes lignées ont été mises au point à partir des choriocarcinomes: les BeWo, les JEG-3 et les JAR. Ces trois lignées aneuploïdes ont gardé certaines propriétés des cellules trophoblastiques, notamment la sécrétion d'hCG, d'hPL ou de progestérone. La lignée BeWo est la première lignée trophoblastique ayant été isolée (Pattillo and Gey 1968). Elle possède le même profil ADN que la lignée JEG-3 qui en est un clone particulier ; toutes deux sont des cellules mononucléées. La lignée BeWo est couramment utilisée afin d'étudier les mécanismes de fusion cellulaire, de par sa capacité à fusionner en présence d'AMP cyclique ou de forskoline, à l'inverse des cellules de la lignée JEG-3 qui ne fusionnent pas (Wice et al. 1990). Les JAR quant à elles ont été obtenues par mise en culture directe de cellules obtenues à partir d'une biopsie de choriocarcinome (Pattillo et al. 1971). Ces trois lignées sont également largement utilisées pour étudier l'invasion cellulaire. Même s'ils sont des modèles faciles d'accès, les choriocarcinomes ne permettent pas une approche satisfaisante des fonctions physiologiques spécifiques à chaque population de cytotrophoblastes mais pourraient être de bons modèles d'étude en ce qui concerne l'approche toxicologique.

1.1.3.3.2. Les lignées cellulaires immortalisées

Certaines lignées cellulaires proviennent de la transformation spontanée des cellules au cours de la culture, telles que la lignée HTR-8 (Irving et al. 1995). Cependant, dans de très

nombreux cas, ces lignées résultent de la transfection de gènes immortalisants grand T et petit t du virus simien SV40. C'est notamment le cas des lignées HIPEC65 (Pavan et al. 2003), HTR-8/SVneo, RSVT2, RSVT2/C (Graham et al. 1993; Khoo et al. 1998), SGHPL-4, SGHPL-5 (Choy and Manyonda 1998), SPA-26 (Logan et al. 1992), Swan 71 (Aplin et al. 2006), TCL-1 (Wice et al. 1990) et TEV-1 (HC Feng et al. 2005).

Il est important de définir des marqueurs de cytotrophoblaste extravilleux afin de justifier l'utilisation de ces lignées. En effet, l'immortalisation des cellules peut conduire à la perte de certaines caractéristiques phénotypiques et les lignées ainsi obtenues peuvent être totalement différentes de la cellule d'origine. Dans ce but, le Groupe Européen sur le Placenta a déterminé certains marqueurs : la cytokératine CK7, l'Human Leucocyte Antigen HLA-G et le cluster de différenciation CD9. En effet, CK7 est un marqueur des cytotrophoblastes et CD9 et HLA-G sont spécifiques des trophoblastes extravilleux (King et al. 2000). Cependant, toutes ces lignées n'expriment pas tous les marqueurs et la détection d'autres marqueurs tels que les intégrines ou des hormones placentaires semble nécessaire à la caractérisation de ces lignées trophoblastiques (Manyonda et al. 2001). Il est de plus important de noter qu'un nouveau marqueur de caractérisation du cytotrophoblaste extravilleux a été récemment utilisé et qu'il n'est exprimé par aucune des lignées cellulaires immortalisées testées (HTR8/SVneo, Swan71 et TEV-1). Cette donnée remet donc en cause l'utilisation de ces lignées comme modèle d'invasion trophoblastique (Apps et al. 2009).

1.2. MICROPOLLUANTS

1.2.1. Le phtalate de bis(2-éthylhexyle), polluant de synthèse

1.2.1.1. Définition et exemples d'utilisation

Les phtalates, ou acides phtaliques, sont utilisés comme plastifiants dans l'industrie, et plus particulièrement avec le PVC afin d'en améliorer la souplesse. Le phtalate le plus couramment utilisé, de par son fort pouvoir assouplissant et son faible coup, est le phtalate de bis(2-éthylhexyle) ou DEHP (Figure 9).

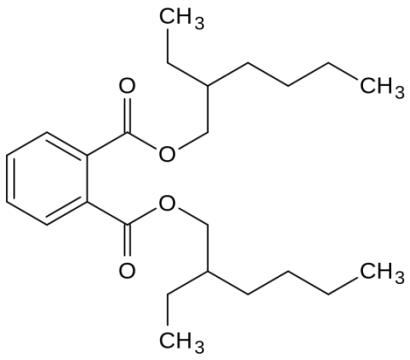


Figure 9. Formule chimique du DEHP

Le DEHP a une large gamme d'utilisations. Il est retrouvé entre autres dans les produits cosmétiques, aérosols (parfums), colles, peintures, vernis, barquettes alimentaires, gants en plastiques, mais également dans les dispositifs médicaux où il entre pour plus de 50% dans la composition des plastiques à usage médical.

Il est utilisé pour ses propriétés plastifiantes ; il est combiné par voie thermique au PVC pour former le PVC plastifié. Au sein du PVC, le DEHP est faiblement lié à la matrice, ce qui confère une structure souple. N'ayant pas de liaison covalente, le DEHP peut facilement migrer hors du PVC, d'autant plus dans les produits à forte affinité, comme les aliments gras ou le sang.

1.2.1.2. Voies d'exposition

La principale voie d'exposition au DEHP est la voie digestive, par l'ingestion d'aliments ayant été au contact avec des emballages contenant le DEHP (Anderson et al. 2001; Fromme et al. 2007). En effet, celui-ci étant faiblement lié à ses polymères de la matrice, il peut migrer du contenant au contenu, notamment si le contenu est gras, comme c'est le cas par exemple des aliments gras tels que le fromage ou la viande ou en cas de chauffe de l'emballage. De plus, les jeunes enfants sont plus particulièrement vulnérables en comparaison aux adultes. Leur exposition moyenne est estimée de 3 à 5 fois supérieure à celle des adultes (INSERM 2011), du fait de leur réflexe à porter à la bouche les jouets et objets mais également car ils ingèrent une plus grande quantité de nourriture rapportée à leur poids comparativement à un adulte.

Le DEHP étant présent dans les produits cosmétiques, une seconde voie d'exposition au DEHP est la voie cutanée.

Une autre voie importante à prendre en compte est la voie intraveineuse, qui concerne une certaine catégorie de population. En effet, les dispositifs médicaux en PVC souple tels que les lignes et poches de perfusion, drains, voies d'abord veineuses ou artérielle et cathéters, contiennent du DEHP qui peut se détacher de la matrice et migrer dans le sang. Les personnes à risque face à cette voie d'exposition sont entre autres les déficients rénaux ayant régulièrement recours à la dialyse et les personnes subissant une hospitalisation longue durant laquelle l'organisme est en contact avec des poches de sang ou des sondes intraveineuses. Il ne faut pas non plus négliger les femmes enceintes hospitalisées chez qui le DEHP peut atteindre le fœtus. Les bébés hospitalisés sont également fortement exposés au DEHP présent dans les tubulures et autres dispositifs médicaux, de par la grande quantité de DEHP relarguée par rapport à leur poids (Calafat et al. 2004; Green et al. 2005; Weuve et al. 2006). L'European Chemicals Bureau a estimé en 2008, que l'exposition au DEHP pouvait atteindre 3000µg/kg/j chez les adultes hémodialysés et 1700 µg/kg/j chez des nouveau-nés transfusés, soit près de 20 à 80 fois la dose de référence (Barbier 2011b).

La voie respiratoire est une voie d'exposition non prépondérante en ce qui concerne le DEHP. En effet, bien qu'il soit présent dans des produits tels que les parfums ou peintures, le

DEHP est très peu volatile et l'exposition par inhalation est mineure comparativement aux autres voies d'exposition.

1.2.1.3. Métabolisme

Après avoir pénétré dans l'organisme, le DEHP est rapidement hydrolysé par des lipases présentes dans au niveau du foie, de l'intestin, des poumons, des reins, de la peau, des tissus adipeux et du pancréas, en son métabolite principal, le MEHP (Daniel and Bratt 1974; Koch and Calafat 2009) (Figure 10). Celui-ci subit ensuite des oxydations de la chaîne lipophile aliphatique puis ces composés sont glucoronidés avant d'être éliminés. Les métabolites du DEHP sont excrétés dans les fèces et les urines (Green et al. 2005; Silva et al. 2006). Ils peuvent d'ailleurs être couramment dosés dans les urines en tant que biomarqueurs d'exposition au DEHP (Barr et al. 2003; Kato et al. 2004). Les métabolites sont également retrouvés dans le lait maternel (Fromme et al. 2011). De plus, certaines études ont mis en évidence qu'il peuvent également passer la barrière placentaire (Mose et al. 2007a; Mose et al. 2007b) et sont détectables dans le cordon ombilical à des concentrations de l'ordre du micromolaire (YJ Huang et al. 2014; Latini et al. 2003; YH Zhang et al. 2009).

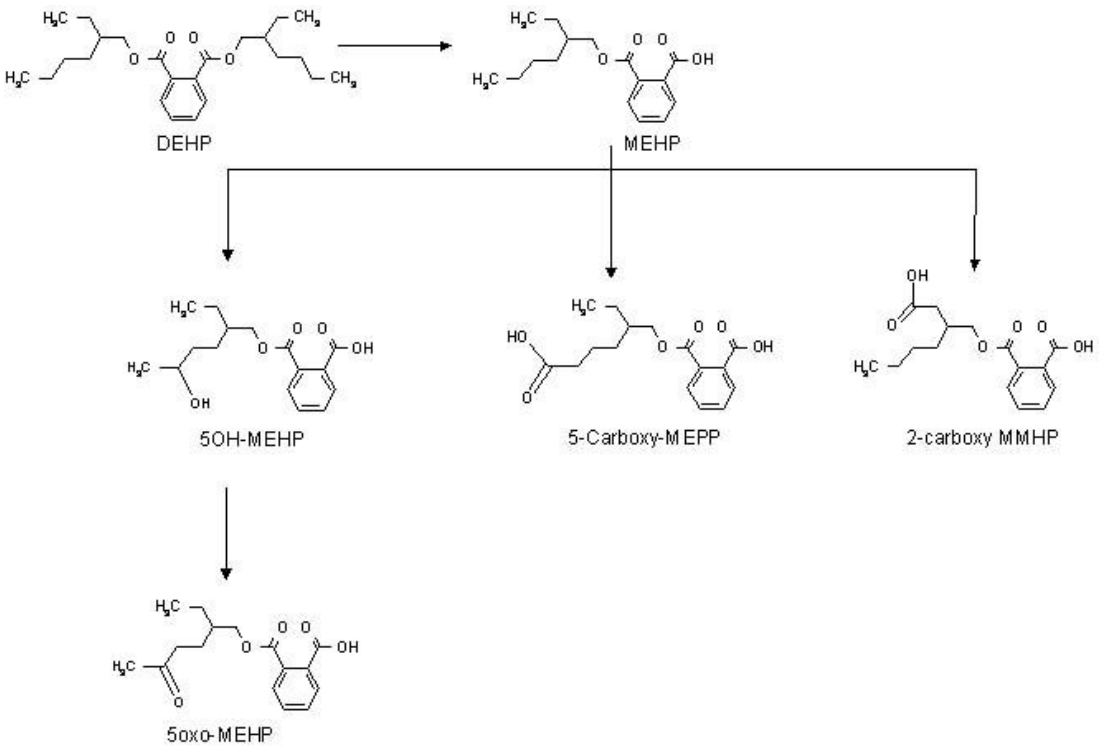


Figure 10. Métabolisation simplifiée du DEHP

1.2.1.4. Effets connus

1.2.1.4.1. Effets physiologiques recensés

Divers effets du DEHP et de ces métabolites ont étés mis en évidence chez l'animal mais aussi chez l'Homme.

Les études ont tout d'abord démontré des effets chez le rat après des doses répétées de phtalate. Elles ont montré une néphrotoxicité, cardiotoxicité, hépatotoxicité (prolifération des péroxysomes, apparition de tumeurs hépatiques) mais également des altérations du système reproducteur mâle(baisse de la fertilité, atrophies testiculaires, poids fœtaux réduits, mortalité fœtale, malformations...) (INRS 2004) ainsi qu'une baisse de la fertilité chez le mâle et la femelle et des effets anti-androgéniques (ouverture vaginale, séparation du prépuce, non régression des mamelons, hypospadias, diminution de la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig) (Akingbemi et al. 2001; INRS 2010).

Des études réalisées chez l'Homme ou sur des modèles humains ont ensuite permis de mettre en évidence que le DEHP et ses métabolites ont également des effets adverses chez

l'Homme. Notamment, Lambrot a par exemple montré que le DEHP induit la disparition de 40% des cellules germinales fœtales sur un modèle de développement de testicule *in vitro* (Lambrot et al. 2009). De plus, une exposition *in utero* au DEHP est associée à une distance ano-génitale diminuée, une taille de pénis réduite et une descente des testicules incomplète chez des petits garçons examinés à 1 an mais également à un risque de naissance prématurée (Ferguson et al. 2014b; Swan 2008).

Ces données sur les effets adverses induits par le DEHP et ses métabolites principalement sur la reproduction ont permis de conclure à l'effet PE exercé par le DEHP. Plus précisément, l'effet de perturbation endocrinienne induit par le DEHP a été montré comme étant anti-androgénique. En effet, Stroheker *et al.* ont montré en 2005 sur une lignée cellulaire transfectée avec le gène rapporteur de la luciférase que le MEHP exerce un effet anti-oestrogénique (Stroheker et al. 2005). L'utilisation de rats exposés *in utero* au DEHP a mis en évidence que leur taux de testostérone était diminué mais que l'apport exogène de testostérone chez ces rats permettait de rétablir le taux d'hormone lutéïnisante qui était jusqu'alors déficient et par conséquent de conclure à l'effet anti-androgénique du DEHP (Carbone et al. 2013).

1.2.1.4.2. Altérations cellulaires et moléculaires

1.2.1.4.2.1. Apoptose, stress oxydant et altérations mitochondriales

De nombreuses études ont montré que le DEHP ou ses métabolites induisent des mécanismes apoptotiques, de stress oxydant ou des altérations touchant la mitochondrie sur différents modèles et lignées cellulaires. En particulier, Ban *et al.* ont montré que la lignée de cellules de veine ombilicale HUVEC est particulièrement sensible au MEHP. Ce dernier induit entre autres de l'apoptose caspase dépendante ainsi que du stress oxydant impliquant une augmentation du niveau de malonyldialdéhyde et une diminution du niveau de glutathion, mais aussi des altérations mitochondriales telles qu'une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial (Ban et al. 2014). De plus, sur un modèle *in vivo* de rats exposés *in utero*, les cellules des tubes séminifères montrent un profil apoptotique, de même que les cellules germinales (Borch et al. 2005).

1.2.1.4.2.2. Interactions avec PPARγ

Des études ont montré un lien entre le DEHP et le Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma, PPARγ.

Les PPARs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones qui inclut les récepteurs des rétinoïdes (RAR), des hormones stéroïdiennes (ER, AR) ou des hormones thyroïdiennes (THR) entre autres mais aussi des récepteurs orphelins tels que COUP-TF ou HNF-4 (Laudet et al. 1992). Les PPARs tirent leur nom de leur capacité à induire la prolifération des péroxysomes après activation (Issemann and Green 1990). Cependant, d'autres études ont depuis montré qu'ils contrôlent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et l'homéostasie glucidique mais ils interviennent aussi dans l'invasion trophoblastique (Fournier et al. 2002) et de nombreux processus cellulaires tels que l'apoptose, la prolifération ou l'inflammation.

Trois types de récepteurs nucléaires PPARs codés par trois gènes différents existent : PPARα (NR1C1), PPARβ ou δ (NR1C2) et PPARγ (NR1C3). Ils sont respectivement localisés sur les chromosomes 22, 6 et 3 chez l'Homme (Greene et al. 1995; Sher et al. 1993; Yoshikawa et al. 1996). Le récepteur PPARγ possède différents domaines, tout comme les récepteurs nucléaires en général :

- Une région A/B activatrice indépendante du ligand qui est le site de phosphorylations régulant l'activité du récepteur
- La région C de fixation à l'ADN, responsable de la reconnaissance avec la séquence nucléotidique cible située dans les promoteurs de gènes cible : le *PPAR Response Element* PPRE
- La région charnière D de localisation nucléaire et d'interaction avec les co-facteurs
- La région E/F de liaison avec le ligand, qui contient une large poche hydrophobe pouvant accueillir de nombreux ligands lipophiles (Figure 11).

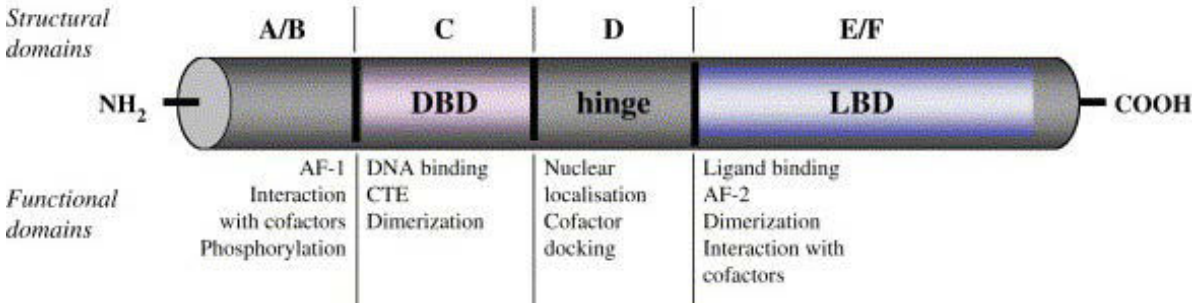
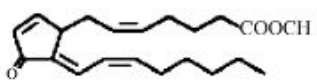


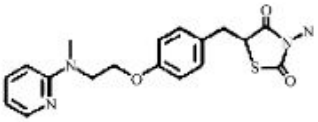
Figure 11. Structure générale du récepteur PPARγ *(Fournier et al. 2007)*.

Parmi les ligands de PPARγ, on retrouve de petites molécules lipophiles comme les acides gras à chaîne moyenne et longue et les eïcosanoïdes, tels que l'acide arachidonique ou la 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostagandine J_2 mais aussi des ligands synthétiques telles la rosiglitazone ou la troglitazone (Figure 12). Après activation par un ligand, PPARγ se lie au PPRE sous forme d'hétérodimère avec le récepteur à l'acide rétinoïque 9-cis, RXR, son partenaire exclusif pour moduler l'expression de gènes cible.

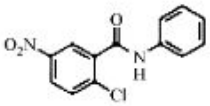
Natural ligands	Synthetic agonists	Antagonists
Arachidonic acid	Thiazolidinediones	GW9662
Eicosapentaenoic acid	Rosiglitazone	T0070907
Linoleic acid	Ciglitazone	BADGE
Linolenic acid	Pioglytazone	G3335
	Troglitazone	Fmoc-Leu
15-HETE		
9-HODE, 13-HODE	GW1929	
15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$-PGJ_2		
azPC		



15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-PGJ_2



Rosiglitazone



GW9662

HETE, hydroxyeicosatetraenoic acid; HODE, hydroxyoctadecadienoic acid; 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-PGJ_2, 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J_2; azPC, hexadecyl azelaoyl phosphatidylcholine; GW1929, (N-(2-benzoylphenyl)-O-[2-(methyl-2-pyridinylamino)ethyl]-L-tyrosine hydrate); GW9662, 2-chloro-5-nitro-N-phenylbenzamide; T00070907, 2-chloro-5-nitro-N-4-pyridinyl-benzamide; BADGE, bisphenol A diglycidyl ether; G3335, dipeptide (H-Trp-Glu-OH); Fmoc-Leu, N-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-leucine.

Figure 12.Ligands naturels, agonistes synthétiques et antagonistes de PPARγ *(Fournier et al. 2007)*.

Il a été montré que, chez le rat, l'exposition de testicules à du DEHP induit une augmentation de l'expression de la protéine PPARγ (Bhattacharya et al. 2005; Ryu et al. 2007), de même que l'exposition de cellules de la granulosa (Ernst et al. 2014). De plus, le MEHP est un ligand exogène de PPARγ comme l'ont démontré Hurst et Waxman dans des tests de liaison au récepteur et des tests de gène rapporteur (Hurst and Waxman 2003; Maloney and Waxman 1999). Il a également été montré que le MEHP active directement ce récepteur afin de promouvoir l'adipogenèse (Feige et al. 2007) ou d'inhiber la prolifération et induire l'apoptose selon le modèle cellulaire (Schlezinger et al. 2004). Ainsi, il semblerait que PPARγ joue un rôle important dans la médiation des effets du DEHP.

1.2.1.5. Réglementation concernant l'utilisation du DEHP

Le DEHP est depuis quelques années classé reprotoxique de catégorie 2, c'est-à-dire « Substance suspectée d'être toxique pour la reproduction humaine » et PE de catégorie 1 ou PE avéré. Ses effets seraient principalement dus à son principal métabolite, le mono-(2-ethylhexyl) phtalate (MEHP) (Tomita et al. 1982; Tomita et al. 1986).

L'exposition humaine aux phtalates est importante et croît régulièrement du fait de la très large utilisation de ces composés. L'exposition réelle étant difficile à évaluer de par la diversité des sources et voies d'exposition aux phtalates, des normes et directives sont régulièrement mises en place et mises à jour afin de limiter l'exposition des populations.

La principale voie d'exposition au DEHP pour la population générale étant la voie orale suite à un contact avec des aliments gras, la directive 2007/19/CE a interdit son usage pour les plastiques en contact avec ce type d'aliments et impose des limites de migration spécifiques dans toutes les autres applications alimentaires.

En ce qui concerne l'exposition cutanée par les cosmétiques, elle est réglementée par le règlement 1223/2009 du Parlement Européen qui interdit depuis 2010 l'utilisation dans les produits cosmétiques de substances classées cancérogènes et/ou mutagènes et/ou toxiques pour la reproduction (CMR) de catégorie 1 ou 2, parmi lesquelles le DEHP. Toutefois, ce règlement prévoit l'autorisation de l'emploi des substances classées CMR de catégorie 2 lorsque, au vu de l'exposition et de la concentration, elles sont considérées comme sûres

pour une utilisation dans les produits cosmétiques par le Comité Scientifique Européen pour la Sécurité des Consommateurs.

Jusqu'à présent, la directive 2007/47/CE imposait aux fabricants de dispositifs médicaux « destinés à administrer dans l'organisme et/ou à retirer de l'organisme des médicaments, des liquides biologiques ou autres substances, ou des dispositifs destinés au transport et au stockage de ces liquides ou substances » contentant des phtalates classés CMR de catégorie 1 ou 2 d'étiqueter spécifiquement ces dispositifs médicaux, de justifier l'utilisation de cette substance, d'indiquer dans la notice d'information les éventuels risques et de prendre des mesures de précautions appropriées si les dispositifs médicaux sont destinés aux enfants ou femmes enceintes ou allaitantes (The European Parliament and the Council of the European Union 2007). En supplément de ces mesures entrées en vigueur depuis 2010 et afin de protéger au mieux les populations à risque, l'article LS214-1 de la loi 2012-1442 votée par le sénat interdit spécifiquement l'utilisation du DEHP dans les dispositifs médicaux en pédiatrie, services de néonatalogie et maternité à partir du 1er juillet 2015.

De plus, afin de limiter plus encore l'exposition des enfants, la directive européenne 2005/84/EC interdit depuis 2005 l'utilisation des phtalates dans les jouets et objets de puériculture susceptibles d'être portés à la bouche par les enfants de moins de trois ans.

1.2.2. Le benzo(a)pyrène, polluant naturel

1.2.2.1. Origine

Le benzo[a]pyrène(BaP) appartient à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Il est composé de cinq cycles aromatiques (figure 13). Le BaP est omniprésent dans l'environnement puisqu' il provient de la combustion incomplète de différentes sources organiques, naturelles ou anthropiques. Les feux de forêt, la combustion du charbon ou du pétrole font partie des sources naturelles (Council 1983). Les activités de l'Homme notamment les émissions automobiles, incinérations, chauffage domestique, fumée de tabac, mode de cuisson des aliments (Phillips 1999), conduisent à la combustion des sources anthropiques.

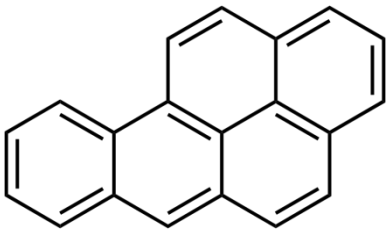


Figure 13. Formule chimique du BaP

1.2.2.2. Voies d'exposition

La principale voie d'exposition au BaP est la voie respiratoire, du fait du tabagisme et de la pollution atmosphérique. Son absorption est rapide mais dépend de la forme sous laquelle le BaP est inhalé et plus particulièrement de la taille des particules sur lesquelles il est adsorbé. L'exposition à la fumée de tabac chez les femmes enceintes a suscité de nombreuses études concernant d'une contamination potentielle du fœtus via le placenta (Karttunen et al. 2010; Rossner et al. 2009; Sanyal and Li 2007; Topinka et al. 2009). Ces dernières ont montré que le BaP présent dans la circulation maternelle peut passer la barrière placentaire et atteindre le compartiment fœtal.

Le BaP étant hautement lipophile, il peut aussi s'accumuler fortement dans les aliments, par dépôt atmosphérique (végétaux), accumulation dans les espèces animales (viandes, poissons) ou au cours de la transformation de produits tels que les viandes et poissons grillés lors de la cuisson. La voie digestive est donc une autre voie d'exposition à prendre en compte en ce qui concerne le BaP. Dans ce cas encore, le BaP est rapidement absorbé au sein de l'organisme par cette voie.

L'exposition par voie cutanée est quant à elle relativement restreinte.

La diffusion du BaP au sein de l'organisme a lieu très rapidement après exposition. Il est retrouvé en quelques minutes dans les organes et tissus bien irrigués (Tyrer et al. 1981). Le BaP étant très liposoluble, il peut être stocké dans les glandes mammaires et autres

organes riches en graisses pour ensuite être progressivement relargué dans la circulation sanguine. De plus, des études ont montré que le BaP passe la barrière placentaire et est retrouvé du côté fœtal, dans le cordon ombilical (Guo et al. 2012; Tomatis 1973).

1.2.2.3. Métabolisme et conséquences

Lorsque le BaP entre dans la cellule, il se lie à son récepteur, le récepteur aux aryl hydrocarbones AhR. L'AhR est un récepteur nucléaire capable de lier des ligands exogènes tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les flavonoïdes ou le resvératrol, mais également des ligands endogènes tels que le 7-kétocholestérol, un produit spontané d'oxydation du cholestérol, ou la bilirubine (Billiard et al. 2002; Casper et al. 1999; Savouret et al. 2001; Zhang et al. 2003). La liaison de ligand sur le récepteur à l'AhR localisé dans le cytoplasme entraine sa translocation dans le noyau puis sa liaison à la protéine Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator. Le complexe ainsi formé se lie à l'élément de réponse aux xénobiotiques XRE dans les promoteurs de gènes cibles dont il active la transcription. Parmi ces gènes cibles se trouvent entre autres les enzymes de phase I et II de métabolisation. Après activation de l'AhR par le BaP et transcription des gènes cibles, le micropolluant est rapidement pris en charge par des enzymes de métabolisation de type I, les cytochromes P450 de la famille 1 (CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1) et dont la transcription est induite par le BaP (Abbas et al. 2009), pour être monooxygéné en différents métabolites (Figure 14). Ces derniers subissent alors l'action d'enzymes de phase II afin de les rendre plus hydrophiles et ainsi permettre leur excrétion dans les urines ou les fèces. Parmi les métabolites du BaP excrétés dans les urines, le 3-hydroxybenzo[a]pyrène est couramment dosé afin d'évaluer l'exposition au BaP de certaines catégories de population, notamment chez les travailleurs exposés (Barbeau et al. 2014; Forster et al. 2008; INRS 2014; Payan et al. 2009).

Cependant, il arrive que certains des métabolites ne soient pas conjugués de cette manière et les métabolites ainsi obtenus ne peuvent être éliminés. Parmi ceux-ci, le BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (BPDE) provient de plusieurs oxygénations successives du BaP. Il est son métabolite le plus réactif ; de par son fort pouvoir électrophile, il possède notamment la capacité de former des adduits avec des macromolécules telles que l'hémoglobine, l'albumine ou l'ADN.

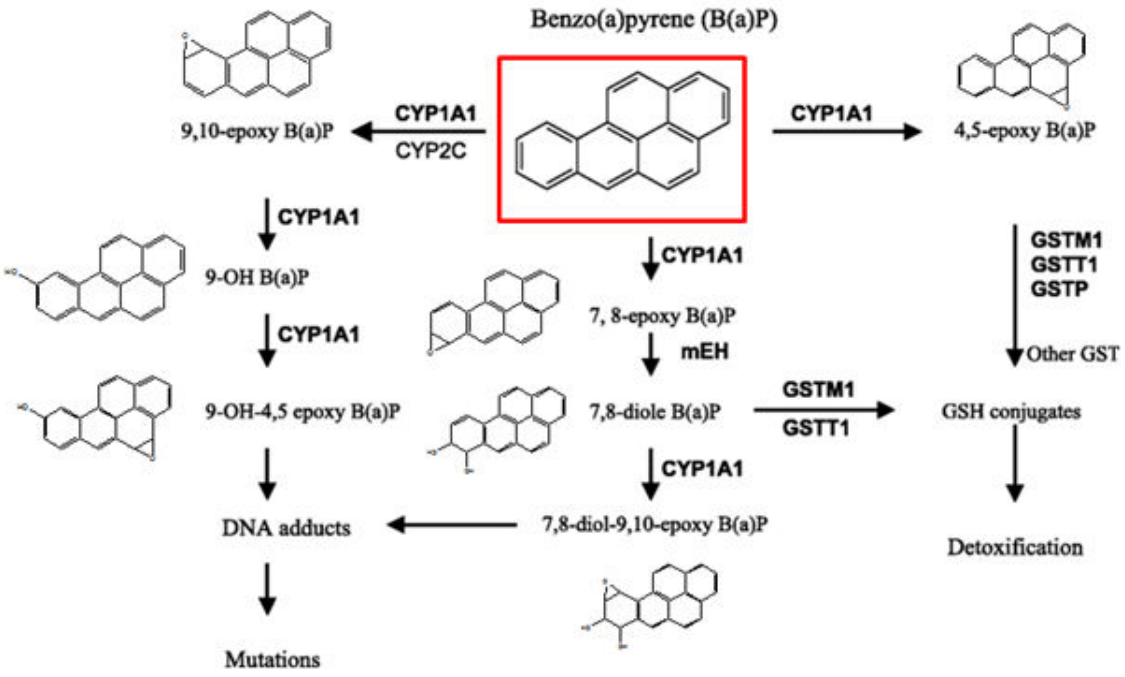


Figure 14.Métabolisation simplifiée du BaP

Le BaP est classé cancérogène de groupe 1, c'est-à-dire avéré, par le Centre International de Recherche sur le Cancer. Il est impliqué entre autre chez les rats, souris et hamsters dans l'apparition de tumeurs de l'estomac, l'œsophage, du larynx ou des poumons (Bae et al. 2005; Goyal et al. 2010; Tung et al. 2014). La formation d'adduits à l'ADN est considérée comme une étape clé dans les phénomènes de cancer ; elle en serait l'un des évènements initiateurs (Miller and Miller 1981; Miller 1970). En effet, les adduit à l'ADN ont des effets mutagènes, carcinogènes et génotoxiques, induisant des cassures de l'ADN (Al-Saleh et al. 2008; Einaudi et al. 2014; Gao et al. 2011; Li et al. 2007). Ces adduits se forment entre autres par la liaison d'un métabolite réactif du BaP, le BPDE, sur les sites nucléophiles de l'ADN, notamment les sites des guanines (Chiang and Tsou 2009).

En plus des effets carcinogènes largement décrits dans la littérature, le BaP est classé en classe 3 de PE, c'est-à-dire qu'aucune preuve scientifique ne prouve un effet PE du BaP mais il est cependant dans la liste des molécules à suivre, notamment dans le programme sur les PE de l'United State Environmental Protection Agency. Différentes études sur l'animal ont en

effet montré que le BaP modifie les niveaux de testostérone, de 17β-œstradiol et de progestérone sur un modèle de mollusque marin et chez certains poissons (Rodas-Ortiz et al. 2008; Tian et al. 2013). De plus, le BaP entraîne également des modifications dans l'expression et l'activité de l'aromatase (CYP19) chez le poisson (Patel et al. 2006), paramètre qui, quand il est modifié, fait partie des arguments pour classer une molécule en tant que PE. Une diminution de la testostérone plasmatique ainsi qu'une augmentation de l'hormone lutéïnisante LH ont également été mises en évidence après exposition par inhalation de rats au BaP (Inyang et al. 2003). Cependant, aucune étude chez l'Homme ne peut, à l'heure actuelle, montrer un effet PE avéré du BaP.

1.3. MICROENVIRONNEMENT CELLULAIRE

Les cellules au sein d'un organe sont en interrelation les unes avec les autres. Elles sont entourées de la matrice extracellulaire et communiquent entre elles. Le microenvironnement correspond à ce qui entoure les cellules, aux signaux interférant avec elles, fournissant à la fois des signaux biochimiques (facteurs de croissance, cytokines) et des contraintes structurelles (molécules d'adhésion) qui sont nécessaires pour dicter des comportements cellulaires adaptés au tissu en question (Schmeichel et al. 1998). Le BaP étant une molécule très lipophile, son entrée dans la cellule peut potentiellement modifier la composante lipidique de la membrane plasmique ainsi que les protéines membranaires. De plus, la composante matricielle est très importante dans l'apparition de cancer par des agents carcinogènes tels que le BaP, pour la migration des cellules et le développement de tumeurs. Nous nous intéresserons donc au microenvironnement matriciel qui correspond aux composants de la matrice extracellulaire et au microenvironnement lipidique incluant des éléments des membranes cellulaires.

1.3.1. Microenvironnement matriciel

La matrice extracellulaire correspond à un enchevêtrement complexe de macromolécules sécrétées par les cellules dans l'espace intracellulaire. Elle comporte différents composants, des polysaccharides aux protéines fibrillaires structurales en passant par les protéines d'adhérence.

1.3.1.1. Le récepteur CD44

Les polysaccharides sont des macromolécules glucidiques. Parmi celles-ci se trouvent les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes, dont l'un des plus abondants est le hyaluronate de sodium. Afin d'induire des réponses cellulaires, le hyaluronate de sodium peut se lier à ses récepteurs, notamment au plus connu qui est le CD44. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire présente sous différentes isoformes (Screaton et al. 1992). Toutes possèdent un module de liaison NH-terminal sur lequel le hyaluronate de sodium peut se fixer. De plus, le récepteur CD44 est présent sur presque tous les types cellulaires, excepté les hématies. La liaison du hyaluronate de sodium sur son récepteur peut induire différentes réponses, dépendantes entre autre de son poids moléculaire et par conséquent de la

longueur de la chaîne de disaccharides. Par exemple, le hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire se fixant sur son récepteur CD44 bloque le cycle cellulaire en phase S tandis qu'un hyaluronate de faible poids moléculaire entraîne la progression en phase G1 et l'entrée en phase S (Cuff et al. 2001).

1.3.1.2. Métalloprotéases

Afin de réguler les signaux engendrés au sein de la matrice extracellulaire, il existe des enzymes, les métalloprotéases matricielles, qui dégradent cette dernière. Les métalloprotéases sont des endopeptidases capables de dégrader tous les types de protéines de la matrice extracellulaire. Elles sont également impliquées dans le clivage de récepteurs cellulaires de surface, le relargage de ligands apoptotiques ou l'inactivation de cytokines. Leur activité a aussi un rôle dans les phénomènes de prolifération cellulaire, de migration, de différenciation et d'angiogenèse (Q Chen et al. 2013; Gialeli et al. 2011; Ries 2014).

Les Tissue Inhibitors of Metalloproteinase ou TIMP sont des inhibiteurs spécifiques des métalloprotéases. Cette famille comprend 4 membres, de TIMP1 à TIMP4, et permet l'inhibition de toutes les métalloprotéases. En particulier, TIMP1 est une glycoprotéine exprimée dans la majorité des tissus. Une expression accrue de cette protéine est associée entre autre à des cancers, notamment du poumon, de la thyroïde et du système digestif (Griffith et al. 2006; Grunnet et al. 2013; Wistuba et al. 2001).

1.3.2. Microenvironnement lipidique

Le microenvironnement lipidique correspond à la composante lipidique des cellules, c'est à dire les membranes, et aux protéines qu'elles contiennent. La membrane plasmique est constituée de zones particulières, rigides car riches en cholestérol et sphingolipides, nommées « lipid raft domains » ou radeaux lipidiques. Ces zones membranaires sont le premier élément d'une grande variété de réactions intracellulaires, de par leur richesse en récepteurs qui entraînent des cascades de signalisation en réponse à une stimulation. Ils contiennent entre autre des récepteurs transmembranaires importants dans la signalisation cellulaire et le trafic de vésicules.

Des études au sein de notre laboratoire ont montré que l'utilisation de formulations huileuses, sur modèles *in vitro* mais aussi *in vivo* induit un changement dans la composition en acides gras de la membrane plasmique (Dutot et al. 2009) et ainsi la réponse cellulaire à divers stress. En effet, des huiles riches en acides gras poly-insaturésω-3sont capables de modifier la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ainsi que les altérations mitochondriales et le stress oxydant sur un modèle *in vitro* de rétinopathie diabétique (Dutot et al. 2011). Ces modulations des réponses cellulaires semblaient passer par des modifications de l'expression de la cavéoline-1, protéine marqueur des radeaux lipidiques appelés cavéoles.

Le microenvironnement lipidique des cellules joue donc un rôle structural mais aussi fonctionnel essentiel aux voies de signalisation cellulaires. Parmi les protéines présentes dans la membrane plasmique, nous nous intéresserons plus particulièrement au récepteur P2X7 et à la cavéoline-1.

1.3.2.1. Récepteur P2X7

1.3.2.1.1. Généralités sur le récepteur P2X7

Les récepteurs P2 appartiennent à une large famille de protéines membranaires subdivisée en deux sous-types: les récepteurs P2X qui sont des canaux cationiques et les récepteurs P2Y couplés à des protéines G hétérotrimériques (Abbracchio and Burnstock 1994). Actuellement, sept gènes codant les récepteurs P2X et huit P2Y ont été clonés et identifiés dans divers types cellulaires et tissus (Burnstock and Kennedy 1985; Sak and Webb 2002). Parmi la sous-famille de récepteurs P2X, la communauté scientifique porte un intérêt certain au récepteur P2X7, notamment pour le rôle qu'il exerce en tant que régulateur de pathologies inflammatoires (Lister et al. 2007). En effet, le récepteur P2X7 est exprimé dans de nombreux types cellulaires, dont les cellules du système immunitaire, et des études ont montré que son activation par son ligand naturel, l'ATP, augmente la libération de cytokines pro-inflammatoires et apoptotiques (Bianco et al. 2006; Pelegrin and Surprenant 2006). Le récepteur P2X7 a dans un premier temps été cloné à partir de cerveau de rat (Surprenant et al. 1996) puis a été identifié dans les astrocytes et les cellules de la microglie (Ballerini et al. 1996; Bianco et al. 2006; Brandle et al. 1998).

1.3.2.1.1.1. Agonistes

Le ligand naturel du purinorécepteur P2X7 est l'ATP. Il nécessite de fortes concentrations, supérieures à 0,1mM pour être activé. Son ligand synthétique, le 2,3-(benzoyl-4benzoyl)-ATP est un agoniste 10 à 30 fois plus puissant que l'ATP (Erb et al. 1990; Gonzalez et al. 1989).

1.3.2.1.1.2. Antagonistes

Parmi les molécules antagonistes du récepteur P2X7 se trouvent des cations divalents. L'inhibition fonctionnelle qu'ils exercent a été mise en évidence très rapidement après le clonage du récepteur P2X7 (Surprenant et al. 1996). Le calcium, le magnésium, le zinc et le cuivre sont de puissants inhibiteurs du récepteur P2X7 chez le rat, avec des CI50 (concentrations nécessaires pour avoir 50% d'inhibition de l'activation des récepteurs) respectivement de 2900, 500, 11 et 0,5µM (Virginio et al. 1997). Deux hypothèses ont été émises pour expliquer cette inhibition. La première hypothèse est l'interaction des cations divalents avec les charges négatives de l'ATP, empêchant ainsi sa fixation sur le récepteur (Steinberg and Silverstein 1987). La seconde hypothèse est que l'interaction des cations divalents sur les résidus histidine du récepteur bloquerait de manière allostérique la fixation des activateurs (Acuna-Castillo et al. 2007).

Le récepteur P2X7 peut également être inhibé par d'autres molécules, telles que des porteurs de fonction aldéhyde comme le pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4-disulfonique (PPADS) ou l'ATP oxydé en positions 2' et 3' (oATP). Le PPADS a dans un premier temps été montré comme étant un inhibiteur des récepteurs de la famille P2 avant que d'autres études ne mettent en évidence qu'il est 10 à 20 fois plus sélectif pour les récepteurs de la sous famille P2X que ceux de la sous famille P2Y (Lambrecht et al. 2002). En ce qui concerne l'oATP, il est décrit comme antagoniste sélectif des récepteurs P2X7 présents sur la membrane des macrophages (Murgia et al. 1993) et l'inactivation du récepteur par cette molécule est irréversible.

L'analogue du colorant alimentaire Brilliant Blue FCF, le Brilliant Blue G, est un antagoniste du récepteur P2X7 couramment utilisé dans les études scientifiques. Son innocuité et sa sélectivité en font un candidat idéal pour bloquer l'activation du récepteur

P2X7 (Jiang et al. 2000; Peng et al. 2009; Remy et al. 2008; Wang et al. 2004). Le Brilliant Blue G inhibe de manière non compétitive le récepteur P2X7, impliquant une modulation allostérique du site de fixation de l'agoniste similaire à l'action de cations divalents tels que le cuivre ou le magnésium (Virginio et al. 1997).

1.3.2.1.1.3. Localisations subcellulaires du récepteur P2X7

Des études ont mis en évidence que les membres de la famille P2X et en particulier P2X7 sont exprimés dans les membranes plasmiques, au niveau des « lipids raft domains » (Barth et al. 2007; Garcia-Marcos et al. 2006).

D'autres études ont également indiqué que le récepteur P2X7 est retrouvé au niveau de la membrane nucléaire, notamment dans les cellules musculaire lisses (Menzies et al. 2003).

1.3.2.1.1.4. Fonctions cellulaires du récepteur P2X7

Il semble difficile d'associer le récepteur P2X7 à une seule et unique voie de signalisation. En effet, dès son clonage, il a été montré que l'activation du récepteur P2X7 est liée à une modification du potentiel membranaire cellulaire (Surprenant et al. 1996). De plus, au vu de sa localisation au sein de la membrane plasmique, le récepteur P2X7 peut lier les protéines de la matrice extracellulaire et du cytosquelette telles que la lamine ou l'actine, ainsi qu'une tyrosine phosphatase impliquée dans les mécanismes de rétrocontrôle du récepteur (Kim et al. 2001). Parmi d'autres fonctions, le récepteur P2X7 active la phospholipase D et les kinases effectrices de Rho (ROCKs) via l'activation de la protéine GTPase Rho mais aussi la phospholipase A2 et la protéine au carrefour de plusieurs voies cellulaires, NF-κB (el-Moatassim and Dubyak 1992; Humphreys and Dubyak 1996; Verhoef et al. 2003). L'activation du récepteur P2X7 induit la formation réversible d'un canal ionique perméable au calcium, sodium et potassium. Le flux ionique de potassium entraine un changement de concentrations intracellulaire et extracellulaire menant à l'activation de l'inflammasome *via* la caspase 1 et la libération d'interleukine pro-inflammatoire IL-1β (Ferrari et al. 2006; Kahlenberg and Dubyak 2004). L'activation du récepteur P2X7 conduit également à l'activation de la caspase 3, qui peut être l'un des évènements intervenant dans le déclenchement de mécanismes cytolytiques, suite à la formation de pores. Il a également

été montré que des changements morphologiques tels que l'apparition de bourgeonnements de la membrane plasmique sur des cellules sont associés à l'activation du récepteur P2X7 (Mackenzie et al. 2005; Verhoef et al. 2003).

Le récepteur P2X7 a également la capacité de former un pore cytolytique après activation prolongée ; la formation de ce pore est possible grâce à l'extrémité C-terminale du récepteur P2X7 qui lui est particulière (Rassendren et al. 1997). Ce pore permet l'entrée de molécules allant jusqu'à 900Da ; cette propriété caractéristique du récepteur P2X7 permet son étude avec des sondes fluorescentes imperméables comme le YO-PRO-1 (Smart et al. 2003; Surprenant et al. 1996). Plusieurs protéines sont également associées au récepteur P2X7. Celles-ci ont un rôle dans la régulation et la formation du pore, comme c'est le cas de la pannexine-1 ou la myosine non musculaire (Pelegrin and Surprenant 2006). Le mécanisme d'activation du récepteur P2X7 menant à la formation du pore cytolytique est complexe. Pelegrin en a cependant a proposé un modèle (figure 15) (Pelegrin 2011). Au repos, le récepteur P2X7 est présent sous la forme symétrique d'un trimère associé à la pannexine-1 et à la myosine non musculaire. Le canal et le pore P2X7 sont alors fermés. La fixation d'une première molécule d'ATP sur le récepteur P2X7 entraine un changement conformationnel conduisant à l'asymétrie du récepteur. La deuxième molécule d'ATP entraîne l'ouverture du canal ionique, perméable entre autre au calcium et sodium. La fixation de la troisième molécule d'ATP restaure la symétrie du récepteur et permet la dilatation du pore. Cette configuration conduit à la dissociation de la myosine non musculaire et la pannexine-1 du récepteur P2X7, permettant ainsi le passage d'ions mais aussi de sondes anioniques et cationiques.

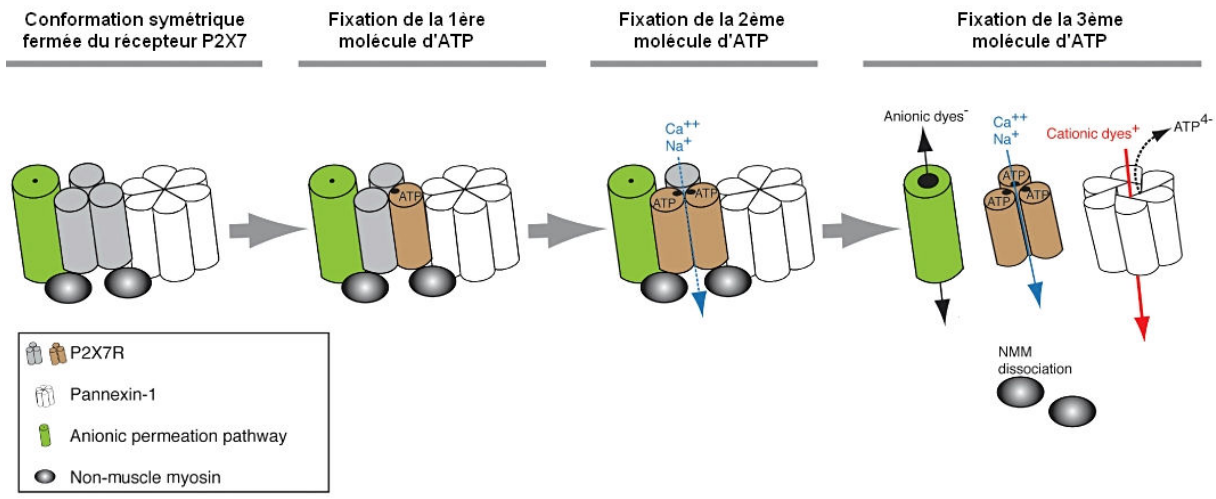


Figure 15. Schéma de l'ouverture du pore cytolytique P2X7*(d'après Pellegrin, 2011)*

1.3.2.1.2. Conséquences biologiques de l'activation du récepteur P2X7

Le récepteur P2X7 est généralement décrit comme étant un récepteur cytolytique. En effet, son activation entraîne un changement de l'équilibre ionique au sein du cytoplasme. De plus, le pore ainsi formé reste ouvert tant que le ligand est lié au récepteur. Ainsi, si la stimulation par l'ATP qui a lieu physiologiquement est prolongée, les cellules sont endommagées de manière irréversible et s'engagent dans les voies de mort. De nombreuses pathologies sont associées à une activation prolongée du récepteur P2X7, telles que la maladie d'Alzheimer, la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou la maladie d'Huntington.

Le récepteur P2X7 est surexprimé au niveau des plaques séniles retrouvées dans la maladie d'Alzheimer, ce qui pourrait entraîner le clivage protéolytique des protéines membranaires (McLarnon et al. 2006; Parvathenani et al. 2003). De plus, *in vivo*, le peptide β-amyloïde retrouvé au niveau de ces plaques séniles, induit le relargage d'ATP, la libération d'interleukine pro-inflammatoire IL-1β, l'augmentation de calcium intracellulaire et augmente la perméabilisation de la membrane plasmique. Cependant, cette étude n'a pu mettre en évidence les mêmes observations chez la souris Knock Out pour le récepteur P2X7 (Sanz et al. 2009; Sanz et al. 2012).

D'un point de vue physiopathologique, la dégénérescence maculaire liée à l'âge est la transposition de la maladie d'Alzheimer au niveau de la rétine. Gu*et al.* ont ainsi montré qu'un haplotype rare de P2X7 pourrait être un facteur de risque pour la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Gu et al. 2013). Chez l'Homme, la quantité d'ATP présente dans l'humeur vitrée est augmentée en cas de dégénérescence maculaire liée à l'âge. De plus, *in vitro* la quantité d'ATP ainsi retrouvée tend à accélérer l'apoptose des photorécepteurs et l'utilisation de Brilliant Blue G, un inhibiteur spécifique du récepteur P2X7 inhibe cette apoptose (Notomi et al. 2013). Pour révéler les mécanismes cellulaires sous-jacents, nous avons démontré *in vitro* sur un modèle de cellules gliales rétiniennes incubées avec le peptide β-amyloïde, impliqué dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge, que ce dernier induit l'activation du récepteur P2X7. L'utilisation de Brilliant Blue G permet de réduire l'activation de ce récepteur et l'association du Brilliant Blue G avec les huiles riches en acides gras polyinsaturés ω-3 prescrites aux patients souffrant de dégénérescence maculaire liée à l'âge conduit à une inhibition totale de l'activation du récepteur P2X7, ce qui confirme *in vitro* l'implication du récepteur P2X7 dans la réponse cellulaire au peptide β-amyloïde (Article soumis dans Nutrition & Metabolism, annexe B).

L'implication du récepteur P2X7 a également été démontrée dans la maladie d'Huntington. En effet, l'augmentation de son expression et de son activation dans les terminaisons synaptiques, modifiant ainsi la perméabilité au calcium a été mise en évidence sur des cerveaux de souris modèles pour cette pathologie. De plus, l'utilisation de Brilliant Blue G sur un modèle *in vivo* de maladie de Huntington a démontré un effet préventif de l'apoptose neuronale. Ces données laissent donc à penser qu'une perturbation de l'expression du récepteur P2X7 induit la mort des cellules neuronales, contribuant ainsi à la pathogenèse de la maladie (Diaz-Hernandez et al. 2009).

Le récepteur P2X7 semble également intervenir dans le cancer. En effet, une diminution de l'expression du récepteur P2X7 dans des cellules cancéreuses a été mise en évidence (YH Feng et al. 2005; Fu et al. 2009; Merriman et al. 2005).Ceci pourrait alors expliquer en partie la résistance de ces cellules aux mécanismes apoptotiques.

1.3.2.2. Cavéoline-1

Les cavéoles sont des microdomaines présents dans les radeaux lipidiques de la membrane. Elles correspondent à des invaginations de 50 à 100 nm de diamètre au niveau de la membrane plasmique. Les cavéoles sont retrouvées dans différents types cellulaires et la protéine majoritaire les constituant est la cavéoline-1 (Rothberg et al. 1992).

La cavéoline-1 est une protéine impliquée dans les phénomènes de trafic cellulaire et plus particulièrement dans l'endocytose. Des études ont montré que la cavéoline-1 module l'activité ainsi que la distribution des récepteurs P2X7. En effet, chez la souris Knock Out pour la cavéoline-1, une diminution de l'expression du récepteur P2X7 a été observée en comparaison aux souris sauvages (Barth et al. 2007; Garcia-Marcos et al. 2006).

De plus, la cavéoline-1, tout comme le récepteur P2X7, semblerait impliquée dans le cancer. Elle a un rôle paradoxal dans le développement de cette pathologie puisqu'elle intervient tant dans l'oncogenèse que dans la suppression de tumeur (T Chen et al. 2013; Shatz and Liscovitch 2008).

1.4. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE EXPERIMENTALE

Le placenta est généralement considéré comme une barrière entre la mère et le fœtus qui a pour fonction de protéger ce dernier. Ici, nous le considérons comme un organe à part entière pouvant être la cible de molécules toxiques.

La fenêtre d'exposition *in utero* est importante en ce qui concerne les PE. Il est admis en toxicologie que le risque correspond à l'interaction du danger et de l'exposition. Dans le cas des PE, l'exposition est difficilement contrôlable du fait de la multitude de sources d'exposition (effet cocktail) mais aussi des effets à faible dose de ces polluants et l'absence de linéarité dans la relation dose-effet. Il apparait donc nécessaire d'évaluer le danger. Cette évaluation se base sur la détection de biomarqueurs de l'effet biologique des PE, telle que la sécrétion d'hormones placentaires, mais aussi des marqueurs d'évaluation des effets délétères, tels que la dégénérescence placentaire.

Dans les études cliniques, il est mis en évidence que des perturbations de la grossesse telles que la prématurité, la souffrance fœtale, des pathologies comme le retard de croissance intra-utérin, la prééclampsie voire des fausses couches mais aussi des modifications somatiques au niveau du placenta peuvent être associées à une exposition de la mère à des polluants et/ou à des perturbations hormonales maternelles. Ces perturbations de la grossesse sont généralement associées à une étude du placenta avec analyse des polluants et mesures de biomarqueurs, notamment les hormones humaines. Nous souhaitons mettre au point un modèle *in vitro* d'étude afin de vérifier si des biomarqueurs observés dans ces études cliniques sont également exprimés expérimentalement afin d'extrapoler plus facilement nos données à l'Homme. Nous nous intéresserons donc à détecter des biomarqueurs associés à ces observations cliniques dans la littérature, et notamment des biomarqueurs dosables, tels que la sécrétion d'hPL ou d'hCG, ou encore l'activation de récepteur de dégénérescence (Figure 16).

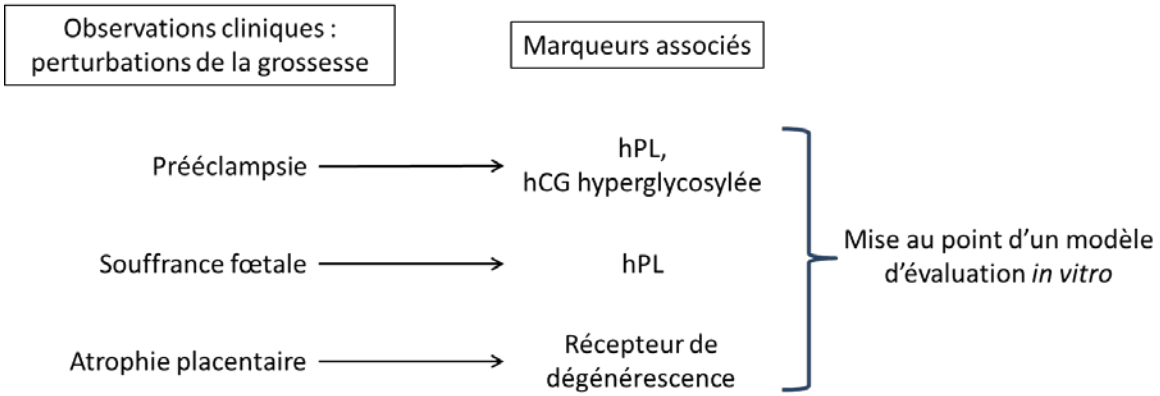


Figure 16. Observations cliniques et marqueurs associés

Plus particulièrement en ce qui concerne l'hCG, nous nous intéresserons à sa forme hyperglycosylée, qui est associée à des mécanismes pathologiques, différente de la β-hCG généralement associée à des phénomènes de prolifération lors de la grossesse (tableau 2).

Forme d'hCG	Phénomène associé
β-hCG	Différenciation cellulaire lors de la grossesse (Le Vee et al. 2014)
hCG hyperglycosylée	Diminution : prééclampsie (Cole 2012)
	Augmentation : invasion cellulaire et cancer (Bourdiec et al. 2013; Cole et al. 2006b; Cole and Butler 2012)

Tableau 2. Différentes formes d'hCG et phénomènes associés

Nous avons choisi dans notre étude de nous intéresser à deux micropolluants différents, le DEHP et le BaP. Le DEHP est un PE dont l'utilisation sera interdite à partir de juillet 2015 dans les dispositifs médicaux. C'est entre autres par cette voie que les femmes enceintes et donc les fœtus peuvent être exposés, notamment lors d'hospitalisations longues. Il apparaît impératif que les molécules de remplacement du DEHP dans les dispositifs médicaux n'exercent pas de perturbation endocrinienne. Il est donc important de mettre au point des

tests de screeening rapides, reproductibles et faciles à réaliser afin de compléter l'ensemble des tests déjà existant pour tester les molécules de remplacement. L'objectif de notre étude est de mettre en évidence ces biomarqueurs de perturbation endocrinienne facilement utilisables à partir de PE connus pour tester les molécules de remplacement mais aussi celles déjà présentes sur le marché.

Le BaP est un carcinogène de référence pouvant atteindre le placenta ; il peut potentiellement induire la dégénérescence cellulaire. L'objectif de notre étude sur ce micropolluant est de mettre en évidence des biomarqueurs de dégénérescence placentaire extrapolables à d'autres polluants.

TRAVAUX PERSONNELS

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. MODELES D'ETUDE *IN VITRO*

La culture cellulaire se fait dans un environnement stérile, sous hotte à flux laminaire (PSM II, Astec). Les flasques de 75cm² contenant les cellules sont placées dans un incubateur thermostaté à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO_2 et saturée en humidité. Le milieu de culture est changé tous les deux jours.

Les cellules sont décollées par ajout de trypsine et repiquées à plus faible densité lorsqu'elles atteignent environ 90% de confluence.

2.1.1. Modèles *in vitro* de cellules placentaires

- **Culture primaire de cellules placentaires**

Des placentas sont récupérés par le biais de la fondation PremUp en association avec des maternités parisiennes. Après dissociation des différentes types de cellules placentaires par digestion enzymatique puis séparation sur gradient de Percoll par l'Unité Inserm U767 de la Faculté de Pharmacie de l'Université Paris Descartes, les cytotrophoblastes sont récupérés et ensemencés. Ces cellules ont la capacité de fusionner *in vitro*. Les cellules ainsi obtenues constituent une culture primaire, elles ne peuvent être cultivées pendant plusieurs passages et meurent après 72-96 heures en culture.

Les cellules sont maintenues dans du milieu de culture DMEM stérile supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal (SVF), 2mM de glutamine et 50UI/mL de streptomycine et pénicilline.

- **Lignée de cellules BeWo**

La lignée de cellules BeWo (ATCC n° CCL-98) est une lignée issue de choriocarcinome isolée par Pattillo et Gey en 1968 (Pattillo and Gey 1968). Les cellules sont cultivées dans du milieu F-12K stérile supplémenté de 10% de SVF, 2mM de glutamine et 50UI/mL de streptomycine et pénicilline.

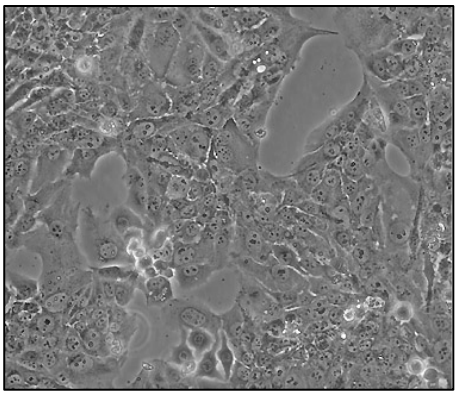


Figure 17. Tapis de cellules BeWo (x100)

- **Lignée de cellules JEG-3**

La lignée de cellules JEG-3 (ATCC n° HTB-36) est un clone de la lignée de cellules placentaires BeWo. Les cellules sont cultivées dans du milieu EMEM stérile supplémenté de 10% de SVF, 2mM de glutamine et 50UI/mL de streptomycine et pénicilline.

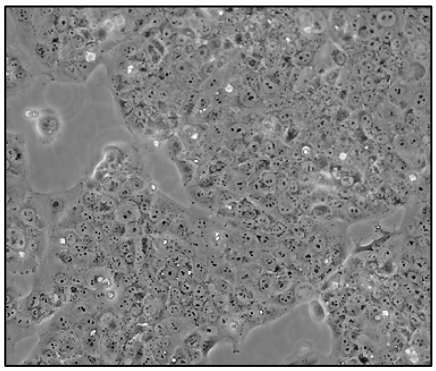


Figure 18. Tapis de cellules JEG-3 (x100)

2.1.2. Modèle *in vitro* de cellules cutanées

La lignée de cellules cutanées HaCat est une lignée de kératinocytes, la couche la plus externe de la peau. Issues de cellules épithéliales de la peau adulte, ces cellules sont spontanément immortalisées. Elles forment un tissu épidermique ordonné et différencié présentant toutes les caractéristiques des kératinocytes humains.

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM stérile supplémenté de 10% de SVF, 2mM de glutamine et 50UI/mL de streptomycine et pénicilline.

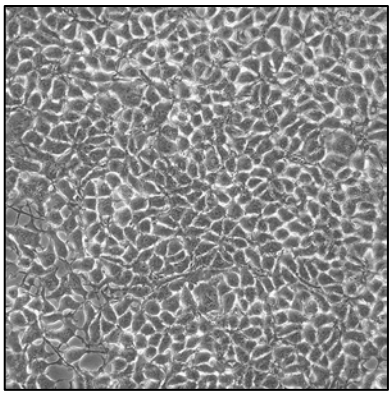


Figure 19. Tapis de cellules HaCat (x100)

2.1.3. Modèle *in vitro* de cellules du système immunitaire

La lignée cellulaire U937 a été obtenue en 1974 à partir de cellules malignes provenant de l'épanchement pleural d'un patient atteint de lymphome histiocytaire. Depuis 1979, il a été établi que la lignée de cellules U937 peut être différenciée en macrophages après incubation avec des esters de phorbol, la vitamine D3, l'interféron γ, le TNF ou l'acide rétinoïque.

Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI stérile supplémenté de 10% de SVF, 2mM de glutamine et 50UI/mL de streptomycine et pénicilline.

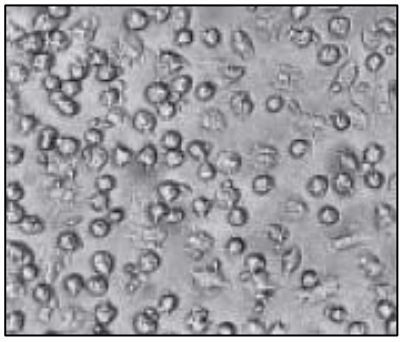


Figure 20. Tapis de cellules U937 différenciées en macrophages (x200)

2.2. TECHNIQUES D'ANALYSE

2.2.1. Microtitration cytofluorimétrique

2.2.1.1. Principe de la microtitration cytofluorimétrique

Le lecteur de microplaque utilisé dans notre étude est un spectrofluorimètre (Safire, Tecan®, Zurich, Suisse) composé de deux monochromateurs permettant une lecture en fluorescence de 230 à 1000 nm et l'enregistrement des spectres de fluorescence en excitation et en émission.

Cet analyseur permet d'effectuer des mesures de fluorescence directement sur cellules vivantes et adhérentes en microplaques. La microplaque est scannée avec un pinceau de lumière d'onde de longueur d'onde définie pour le test, qui illumine chaque puits pendant moins de 0,3 seconde, ce qui évite tout phénomène de « fading » des sondes fluorescentes.

Cette technique est spécifique, sensible (pg-fg / mL), reproductible et permet de mettre au point des méthodes standardisées d'analyse de la cytotoxicité, préconisées notamment lors d'études multicentriques pour l'évaluation de méthodes alternatives en toxicologie cellulaire.

Deux types de tests en microtitration cytofluorimétrique existent :

- les tests MIFALC (Microtitration Fluorimetric Assay on Living Cells) de type I : effectués sur cellules vivantes pendant les premières étapes et nécessitant une étape finale d'extraction pour la détection et la révélation (ex : rouge neutre).

- les tests MIFALC de type II : effectués sur cellules vivantes pendant toutes les étapes, y compris la détection, ce qui permet de réaliser la cinétique de sondes directement en microplaques (par exemple le YO-PRO-1 pour l'activation du récepteur P2X7).

2.2.1.2. Préparation des cellules

Les cellules sont ensemencées dans des microplaques 96 puits (Corning, dont le matériau est assuré de ne pas contenir de DEHP d'après le fournisseur) aux concentrations suivantes, ceci afin d'obtenir la confluence des cellules en 24 heures :

- Culture primaire de trophoblastes : 120 000 cellules / mL
- Lignée de cellules BeWo : 80 000 cellules / mL
- Lignée de cellules JEG-3 : 80 000 cellules / mL
- Lignée de cellules HaCat : 80 000 cellules / mL
- Lignée de cellules U937 transformées en macrophages: 1 000 000 cellules / mL

Les puits des bords de la plaque ne sont pas ensemencés mais remplis de tampon PBS afin d'éviter « l'effet de bord », qui correspond à une modification du degré d'hygrométrie entre le centre et le bord de la microplaque, qui conduit à une modification de la respiration cellulaire et donc de la prolifération cellulaire. Cet effet entraîne des variations dans les réponses cellulaires et rend les résultats difficilement exploitables.

Les microplaques sont ensuite placées dans un incubateur thermostaté à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO_2 et saturée en humidité. Après 24 heures, les cellules ont adhéré au fond des microplaques et peuvent être incubées avec les différents produits. Le milieu de culture est alors éliminé par retournement de la microplaque, les cellules sont rincées au tampon PBS pour éliminer les débris cellulaires et les produits à tester sont distribués dans les puits de la microplaque, à raison de 200µL par puits. Les tests de microtitration fluorimétrique sont ensuite réalisés après incubation le temps souhaité avec les produits à tester.

2.2.1.3. Tests réalisés en microcytofluorimétrie

- **Mesure de l'intégrité membranaire**

L'intégrité membranaire a été évaluée en réalisant le test au rouge neutre en fluorimétrie (λexcitation = 535nm, λémission = 600nm). Le rouge neutre est à la fois un colorant vital ou d'inclusion utilisable en photométrie mais aussi une molécule fluorescence utilisable en microcytofluorimétrie proposée dans l'étude de la viabilité cellulaire par Borenfreund et Puerner en 1985. Le rouge neutre est utilisé préférentiellement dans de nombreuses études multicentriques et est exigé dans les textes de normes de standardisation internationales.

Une solution mère de rouge neutre à 0,4% dans de l'eau distillée est préparée et conservée à l'abri de la lumière. La solution utilisée pour le test est issue d'une dilution de la

solution mère au 1/10 dans du milieu de culture sans SVF. Cette solution est centrifugée à 3500 tours / minute pendant 10 minutes afin d'éliminer les éventuels cristaux de sonde qui pourraient endommager les cellules. Après élimination des produits à tester et rinçage des cellules au PBS, la solution fille de rouge neutre est distribuée dans les puits. La microplaque est placée dans l'incubateur pendant 3 heures afin de laisser le temps à la sonde de se fixer aux lysosomes cellulaires. La solution de rouge neutre en excès est éliminée, les cellules sont rincées au PBS puis une solution de révélation composée d'éthanol absolu (50,6%), d'eau (48,4%) et d'acide acétique glacial (1%) est distribuée dans les puits. Après 15 minutes d'homogénéisation de la coloration sous agitation, la microplaque est lue par le Safire.

- **Mesure de la masse mitochondriale**

La nonylacridine orange (NAO) est une sonde fluorescente (λexcitation = 490nm, λémission = 530nm) qui pénètre dans les mitochondries de cellules vivantes indépendamment du potentiel transmembranaire mitochondrial et se fixe au niveau de la membrane mitochondriale. Une variation, augmentation ou diminution, du signal de fluorescence traduit une modification de la masse mitochondriale.

Une solution mère de NAO à 0,01M est préparée dans du DMSO. La solution utilisée pour le test est issue d'une dilution de la solution mère au 1/1000 dans du milieu de culture sans SVF. Après élimination des produits à tester et rinçage des cellules au PBS, la solution fille de NAO est distribuée dans les puits. La microplaque est placée dans l'incubateur pendant 30 minutes. La sonde présente dans le surnageant est éliminée par retournement de la plaque, les cellules sont rincées au PBS puis du milieu de culture sans SVF est ajouté afin de permettre le relargage de la NAO en excès pendant 1 heure. Après rinçage des cellules au PBS, une solution de révélation composée d'éthanol absolu (50,6%), d'eau (48,4%) et d'acide acétique glacial (1%) est distribuée dans les puits. Après 15 minutes d'homogénéisation de la coloration sous agitation, la microplaque est lue par le Safire.

- **Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial par la rhodamine 123**

La rhodamine 123 est une sonde fluorescente (λexcitation = 485nm, λémission = 535nm) qui pénètre dans les mitochondries en fonction du potentiel transmembranaire mitochondrial et se fixe au niveau de la membrane mitochondriale. Une variation,

augmentation ou diminution, du signal de fluorescence traduit une modification de ce potentiel transmembranaire mitochondrial.

Une solution mère de rhodamine 123 à 12,5 mg / mL est préparée dans du DMSO. La solution utilisée pour le test est issue d'une dilution de la solution mère au 1/1250 dans du PBS. Après élimination des produits à tester et rinçage des cellules au PBS, la solution fille de rhodamine 123 est distribuée dans les puits. La microplaque est placée dans l'incubateur pendant 30 minutes. La sonde présente dans le surnageant est éliminée par retournement de la plaque, les cellules sont rincées au PBS puis du milieu de culture sans SVF est ajouté. Après rinçage des cellules au PBS, une solution de révélation composée d'éthanol absolu (50,6%), d'eau (48,4%) et d'acide acétique glacial (1%) est distribuée dans les puits. Après 15 minutes d'homogénéisation de la coloration sous agitation, la microplaque est lue par le Safire.

- **Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial par le JC-1**

La sonde JC-1 permet de déceler des variations du potentiel transmembranaire mitochondrial. Elle se fixe dans la membrane interne mitochondriale sous forme de monomère lorsque l'activité est basse et émet une fluorescence dans le vert (λexcitation = 485nm, λémission = 520nm). Lorsque l'activité est haute, la sonde se fixe sous forme d'agrégats et émet une fluorescence dans le rouge (λexcitation = 485nm, λémission = 600nm).

Une solution mère de JC-1 à 6,5 mg / mL est préparée dans du DMSO sous agitation. La solution utilisée pour le test est issue d'une dilution de la solution mère au 1/1000 dans du PBS. Après élimination des produits à tester et rinçage des cellules au PBS, la solution fille de JC-1 est distribuée dans les puits. La microplaque est placée dans l'incubateur pendant 15 minutes puis lue par le Safire.

- **Mesure de l'activité des caspases 3 et 8**

Le dosage fluorimétrique de l'activité des caspases 3 et 8 repose sur le clivage d'un substrat, respectivement l'acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-méthyl coumarine et l'acétyl-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-méthyl coumarine, par les caspases activées. Ces substrats contiennent une séquence (DEVD ou IETD) reconnue par les caspases qui la clivent, libérant ainsi une molécule fluorescente, l'amino-méthyl coumarine. La fluorescence ainsi mesurée

est proportionnelle à la quantité amino-méthyl coumarine libérée et donc à l'activité des caspases.

Ce test est réalisé selon le protocole fourni par le fabricant Sigma-Aldrich.

- **Mesure de la condensation de la chromatine**

Le Hoechst 33342 est une sonde fluorescente dans l'UV (λexcitation = 365nm, λémission = 450nm) couramment utilisée pour déterminer le contenu en ADN des cellules. Après avoir franchi la membrane plasmique dans altération, la sonde se fixe sur les séquences riches en bases A-T de l'ADN et émet alors une fluorescence bleue. L'iodure de propidium est un intercalant de l'ADN, comme le Hoechst 33342 et émet une fluorescence rouge. Le Hoechst 33342 marque toutes les cellules, vivantes, apoptose et en nécrose tandis que l'iodure de propidium est exclu des cellules viables et ne marque que les cellules en nécrose beaucoup plus rapidement que le Hoechst 33342. Dans les cellules en apoptose, la condensation de la chromatine induit un effet hyperchrome et bathochrome sur le Hoechst 33342 dont la fluorescence devient plus intense. Il devient ainsi aisé de distinguer quantitativement les cellules vivantes des cellules en apoptose.

Une solution mélange de Hoechst 33342 à 10mg/mL et d'iodure de propidium à 0,5mg/mL est préparée dans du PBS. Après élimination des produits à tester et rinçage des cellules au PBS, la solution est distribuée dans les puits. La microplaque est placée dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes puis lue par le Safire.

Le BaP étant autofluorescent dans l'UV, un autre test de condensation de la chromatine a été utilisé. La sonde Enzo Nuclear ID est fluorescente dans le visible (λexcitation = 488nm, λémission = 520nm) et se lie préférentiellement à la chromatine compactée des cellules en apoptose comparativement aux cellules viables non apoptotiques. Elle permet donc de différencier les cellules viables des cellules en apoptose.

Ce test est réalisé selon le protocole fourni par le fabricant Enzo Life Sciences

- **Mesure de la perméabilité membranaire via l'activation du récepteur P2X7**

Le YO-PRO-1 est une sonde fluorogène (λexcitation = 491nm, λémission = 509nm) de 376DA qui n'entre dans les cellules que si la perméabilité membranaire est altérée *via* l'ouverture des pores membranaires P2X7. Il s'intercale dans l'ADN et émet une fluorescence.

A partir d'une solution mère de YO-PRO-1 à 1mM dans du DMSO, une solution fille est préparée au 1/500 dans du PBS. Après élimination des produits à tester et rinçage des cellules au PBS, la solution fille de YO-PRO-1 est distribuée dans les puits. La microplaque est placée dans l'obscurité à température ambiante pendant 10 minutes puis lue par le Safire.

- **Mesure de l'activité du cytochrome CYP1A1**

La sonde resorufin ethyl ether, ou 7-EROD, permet une mesure catalytique de l'induction des cytochromes CYP1A1 et CYP1B1. Le 7-EROD est transformé par ces cytochromes en résorufine, une molécule fluorescente (λexcitation = 535nm, λémission = 600nm).

Une solution mère de 7-EROD à 2mM est préparée dans du DMSO. La solution utilisée pour le test est issue d'une dilution de la solution mère au 1/1000 dans du milieu de culture contenant 2,5% de SVF. Après élimination des produits à tester et rinçage des cellules au PBS, la solution fille de 7-EROD est distribuée dans les puits. La microplaque est placée dans l'incubateur pendant 6 heures puis lue par le Safire.

- **Evaluation des cassures simple brin de l'ADN**

Le picogreen est une sonde fluorescente (λexcitation = 460nm, λémission = 540nm) se liant à l'ADN double brin. En cas de cassures simples brin de l'ADN, une diminution du signal de fluorescence de la sonde picogreen est observée.

Après élimination du produit à tester, les cellules ensemencées en plaque 6 puits sont rincées au PBS puis un tampon de lyse est ajouté dans les puits. Les cellules sont ensuite grattées à l'aide d'un grattoir, récupérées dans des tubes à centrifuger puis incubées pendant 30 minutes. Le test est ensuite réalisé selon le protocole fourni par le fabricant Invitrogen. Une détermination de la quantité de protéines est effectuée en parallèle suivant la méthode BCA.

- **Mesure du calcium**

La sonde Fluo-4 permet la détection du calcium. En effet, sa fluorescence est augmentée quand elle s'y fixe.

Le test est ensuite réalisé selon le protocole fourni par le fabricant Invitrogen.

- **Mesure de la peroxydation lipidique**

La sonde C11-bodipy permet de mettre en évidence la peroxydation lipidique. Elle se lie aux membranes biologiques par des interactions hydrophobes fortes, sa moitié comportant les 11 carbones pouvant se lier aux bicouches lipidiques. La sonde est très sensible à l'oxydation. Une fois liée aux membranes, elle peut être oxydée par les radicaux $ROO^{\cdot}$ et $RO^{\cdot}$ et ne plus émettre une fluorescence rouge (λexcitation = 488nm, λémission = 520nm) mais une fluorescence verte (λexcitation = 568nm, λémission = 590nm). Cette sonde est insensible aux modifications du microenvironnement telles que le pH ou la polarité du solvant. De plus, elle est photostable et n'est pas cytotoxique.

Une solution mère de C11-bodipy à 2mM est préparée dans du DMSO. La solution utilisée pour le test est issue d'une dilution de la solution mère au 1/1000 dans du milieu de culture sans SVF. Après élimination des produits à tester et rinçage des cellules au PBS, la solution fille de C11-bodipy est distribuée dans les puits. La microplaque est placée dans l'incubateur pendant 30 minutes afin de laisser le temps à la sonde de se fixer aux lipides. Les cellules sont ensuite rincées au PBS puis incubées avec du milieu de culture sans SVF pendant 30 minutes dans l'incubateur. La microplaque est ensuite lue par le Safire.

2.2.2. Analyse par méthode immunoenzymatique

2.2.2.1. Principe de l'analyse par méthode immunoenzymatique

La technique Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) est une technique immuno-enzymatique de détection permettant de visualiser une réaction antigène-anticorps suite à une réaction de colorimétrie produite par l'action sur un substrat d'une enzyme fixée à l'anticorps.

2.2.2.2. Préparation des cellules

Afin de doser les protéines présentes dans le milieu extracellulaire, les cellules sont mises en culture en microplaque 96 puits selon le protocole décrit dans la section précédente et les surnageants de culture cellulaire sont récupérés.

En ce qui concerne les tests nécessitant un lysat cellulaire ou un extrait nucléaire, les cellules JEG-3 sont ensemencées en boîte de Pétri de 10cm de diamètre à 140 000 cellules / mL, avec 10mL de milieu de culture, afin d'obtenir la confluence en 24 heures. Les boîtes de Pétri sont placées à l'incubateur thermostaté à 37°C sous une atmosphère contrôlée à saturée en eau et à 5% de CO_2. Après 24 heures, les cellules ont adhéré au fond des boîtes de Pétri et peuvent être incubées avec les produits à tester.

2.2.2.3. Tests réalisés par méthode immunoenzymatique

- **Evaluation de la production des cytokines IL-1β et TNF-α**

Les cytokines proinflammatoires sont sécrétées dans le milieu extracellulaire en réponse un stress inflammatoire. Leur dosage est réalisé selon le protocole fourni par le fabricant R&D Systems.

- **Dosage des hormones hCG hyperglycosylée et hPL**

Ces hormones sont sécrétées dans le milieu extracellulaire par les cellules placentaires. Leur dosage est réalisé selon le protocole fourni respectivement par les fabricants Cusabio et Diasource, pour l'hCG hyperglycosylée et l'hPL.

- **Dosage de TIMP-1**

L'inhibiteur de metalloprotéase TIMP-1 est présent dans le milieu extracellulaire. Son dosage est réalisé selon le protocole fourni par le fabricant R&D Systems.

- **Evaluation de l'expression de p53 et de sa phosphorylation sur la sérine 46 P-p53 (ser46)**

La protéine p53 est présente au sein de la cellule en particulier dans le noyau et peut-être phosphorylée.

Après élimination des produits à tester et rinçage des cellules au PBS, les cellules sont grattées à l'aide d'un grattoir, collectées puis les culots cellulaires sont rincés deux fois au PBS. Les cellules ont ensuite lysée par un tampon de lyse cellulaire puis les lysats sont centrifugés afin de récupérer les fractions nucléaires. L'évaluation de l'expression de la protéine p53 et de sa forme phosphorylée sur la sérine 46 est réalisée selon le protocole

fourni par le fabricant Cyclex. Une détermination de la quantité de protéines est effectuée en parallèle suivant la méthode BCA.

- **Evaluation de l'activation de NRF-2**

NF-E2-related factor ou NRF-2 est un facteur de transcription impliqué dans les mécanismes de stress oxydant. Après extraction nucléaire selon le protocole du fourni par le fabricant Active motif, l'évaluation de l'activation de la protéine NRF-2 est réalisée selon le protocole fourni par ce même fabricant. Une détermination de la quantité de protéines est effectuée en parallèle suivant la méthode BCA.

- **Evaluation de l'activation de PPARγ**

PPARγ est un facteur de transcription impliqué dans différentes voies de signalisation cellulaire. Après extraction nucléaire selon le protocole du fourni par le fabricant Active motif, l'évaluation de l'activation de la protéine PPARγ est réalisée selon le protocole fourni par ce même fabricant. Une détermination de la quantité de protéines est effectuée en parallèle suivant la méthode BCA.

2.2.3. Analyse par bioluminescence

2.2.3.1. Principe de l'analyse par bioluminescence

L'analyse par bioluminescence repose sur le principe de la transformation d'une molécule biologique non luminescente, généralement de la luciférase NT, en un composé émettant de la lumière, généralement de la luciférase, après ajout de substrats adéquats.

2.2.3.2. Test réalisé par bioluminescence

Les cellules sont ensemencées en microplaque 96 puits selon le protocole décrit précédemment.

- **Evaluation du glutathion total et oxydé**

Le glutathion intervient dans la régulation du stress oxydant au sein de la cellule en maintenant le potentiel redox cytoplasmique et permet l'élimination des espèces réactives de l'oxygène.

Le dosage de la forme totale et de la forme oxydée du glutathion a été réalisé selon le protocole fourni par le fabricant Promega.

- **Evaluation de l'ATP total**

L'ATP est produit lors de la respiration mitochondriale par la chaîne respiratoire mitochondriale. Une perturbation de l'activité mitochondriale peut avoir un impact sur la production d'ATP.

Le dosage de l'ATP total a été réalisé selon le protocole fourni par le fabricant Promega après élimination des surnageants cellulaires.

2.2.4. Analyse par colorimétrie

- **Dosage de protéines par la technique de l'acide bicinchoninique BCA**

Le dosage BCA est un dosage colorimétrique des protéines très sensible. Cette méthode est basée sur la réduction des ions Cu^{2+} en ions Cu^{+} suivie de la formation de complexes colorés du Cu^{+} avec l'acide bicinchoninique. Ces complexes absorbent à une longueur d'onde de 562nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en protéines totales.

Un mélange de BCA et de Cu^{2+} est réalisé selon un ratio 50 :1. 80µL de ce mélange sont ajoutés à 10µL d'extrait protéique à doser. Après 30 minutes d'incubation à l'incubateur, l'absorbance est lue par le Safire.

- **Mesure de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale**

La succinate déshydrogénase est une enzyme appartenant au complexe II de la chaine respiratoire mitochondriale. Le MTT pénètre dans la mitochondrie où il est réduit par cette enzyme en cristaux de formazan, ce qui le fait passer d'une couleur jaune à une couleur violette dans les cellules viables absorbant à 540nm.

Une solution à 0,5mg/mL de MTT est préparée dans du milieu de culture sans SVF. Après élimination des produits à tester et rinçage des cellules au PBS, la solution de MTT est distribuée dans les puits. La microplaque est alors placée dans l'incubateur pendant 3 heures. La solution de MTT en excès est alors éliminée par retournement de la plaque, les cellules sont rincées au PBS puis les cristaux de formazan présents dans les cellules sont lysés par ajout de DMSO. La plaque est ensuite agitée durant 15 minutes afin d'homogénéiser le MTT et est lue au Safire.

2.2.5. Analyse par In Cell Western

2.2.5.1. Principe de l'analyse par In-Cell Western

L'In-Cell Western est une technique permettant d'évaluer l'expression d'une protéine sur cellules entières. Cette technique consiste à réaliser un marquage avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt et un anticorps secondaire directement en microplaque, sur cellules entières préalablement fixées et perméabilisées. L'anticorps secondaire étant couplé à un fluorochrome fluoresçant dans l'infrarouge, la fluorescence émise peut être lue sur le système d'imagerie Odyssey® (Li-Cor ScienceTec), puits par puits. De plus, l'ADN des cellules étant également marqué par une sonde fluorescente, le TO-PRO-3, la quantité de fluorescence émise par le système anticorps primaire / anticorps secondaire lié à la protéine d'intérêt peut être normalisée par rapport au nombre de cellules dans le puits et ainsi donner un niveau d'expression relatif de la protéine.

2.2.5.2. Tests réalisés par In-Cell Western

Les cellules sont ensemencées en microplaque 96 puits selon le protocole précédemment décrit.

Selon notre adaptation du protocole de 2010 d'Audebert (Audebert et al. 2010), le test se déroule ainsi : après élimination des produits à tester et rinçage des cellules au PBS, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 4% durant 20 minutes puis neutralisées par du NH_4Cl à 20mM pendant 2 minutes. Elles sont ensuite perméabilisées par du triton à 0,2% dans du PBS pendant 5 minutes puis bloquées par une solution contenant 10% de SVF et 0,2% de triton dans du PBS pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules sont

ensuite incubées avec l'anticorps primaire pendant 2 heures puis avec l'anticorps secondaire à l'obscurité pendant 1 heure. Lors de cette dernière incubation, du TO-PRO-3 à 2µM est ajouté dans les puits. Les anticorps primaires et secondaires sont dilués dans du tampon PBS contenant 2% de SVF et 0,2% de triton. La plaque est ensuite lue par l'Odyssey à 700nm pour détecter l'ADN et 800nm pour détecter la fluorescence de l'anticorps secondaire.

Ce protocole a été utilisé pour déterminer l'expression du récepteur P2X7, du récepteur CD44 et de la forme phosphorylée de l'histone H2AX, γH2AX, qui apparait en cas de cassures double brin de l'ADN. Les anticorps ont été utilisés aux dilutions suivantes :

- anticorps primaire de lapin dirigé contre le récepteur P2X7 (référence sc-25698, Santa cruz) : 1/100
- anticorps primaire de lapin dirigé contre le récepteur CD44 (référence HPA005785, Sigma-Aldrich) : 1/200
- anticorps primaire de lapin dirigé contre l'histone γH2AX (référence 9718, Cell Signaling) : 1/200
- anticorps secondaire DyLight 800 anti-lapin (référence 5151, Cell Signaling): 1/500

2.2.6. Analyse par Cytomérie en flux

2.2.6.1. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise, à l'aide d'un rayon laser, de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Les cellules en suspension sont guidées à l'aide d'un flux laminaire liquide assurant un défilement en « file indienne » devant un système d'illumination. Ce système d'illumination et de détection permet d'effectuer l'analyse d'une cellule donnée dans un temps très court, de l'ordre de quelques millisecondes. Chaque cellule est étudiée séparément et la distribution des caractères des cellules composant l'échantillon peut ainsi être analysée (taille, structure, fluorescence…). Le cytomètre en flux utilisé dans notre étude est un Accuri C6.

2.2.6.2. Préparation des cellules

Les cellules de notre étude étant toutes adhérentes et la technique de cytométrie en flux nécessitant des cellules en suspension, la préparation des cellules diffère de celle utilisée en microtitration.

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits à une concentration de 150 000 cellules / mL en ce qui concerne les cultures primaires et 120 000 cellules / mL pour la lignée de cellules JEG-3, afin d'obtenir la confluence en 24 heures. Les plaques 6 puits sont placées à l'incubateur thermostaté à 37°C sous une atmosphère contrôlée à saturée en humidité et à 5% de CO_2. Après 24 heures, les cellules ont adhéré au fond des boîtes de Pétri et peuvent être incubées avec les produits à tester. Le milieu de culture est alors éliminé par retournement de la plaque 6 puits, les cellules sont rincées au tampon PBS pour éliminer les débris cellulaires et les produits à tester sont distribués dans les puits de la microplaque, à raison de 2mL par puits. Après incubation de temps souhaité avec les produits à tester, les cellules sont rincées au PBS puis décollées avec de la trypsine pendant 3 minutes. Les cellules sont ensuite collectées dans des tubes à centrifuger dans de la glace puis rincées au PBS. La manipulation doit se faire sur de la glace et le plus rapidement possible afin de limiter les risques de mort cellulaire.

2.2.6.3. Tests réalisés en cytométrie en flux

- **Analyse du cycle cellulaire et de la fragmentation de l'ADN (pic SubG1)**

Après centrifugation et récupération des culots cellulaires, ces derniers sont perméabilisés par une solution de triton à 0,1% dans du PBS contenant 0,5mg/mL de RNAse pendant 5 minutes dans la glace puis incubés avec une solution d'iodure de propidium à 0,5µg/mL pendant 3 minutes. Après centrifugation et élimination de la sonde en excès, les cellules sont remises en suspension dans du PBS et la fluorescence de l'iodure de propidium lié à l'ADN dans les cellules est ensuite lue au cytomètre en flux.

- **Evaluation de l'expression de la protéine ZO-1**

Après centrifugation et récupération des culots cellulaires, ces derniers sont rincés par une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) à 0,5% dans du PBS. Les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre la protéine ZO-1 (Zymed

Laboratories) dilué au 1/100 dans la solution de PBS+BSA pendant 30 minutes. Après rinçage les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) dilué au 1/2000 dans la solution de PBS+BSA pendant 30 minutes. Après centrifugation et élimination de l'anticorps secondaire en excès, les cellules sont remises en suspension dans du PBS et la fluorescence de l'anticorps secondaire est lue par le cytomètre en flux.

- **Evaluation de l'expression de la protéine cavéoline-1**

Après centrifugation et récupération des culots cellulaires, les cellules sont incubées avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre la protéine cavéoline-1 (Sigma-Aldrich) dilué au 1/100 dans du PBS pendant 45 minutes. Après rinçage les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la FITC (Sigma-Aldrich) dilué au 1/40 dans une solution de PBS pendant 30 minutes. Après centrifugation et élimination de l'anticorps secondaire en excès, les cellules sont remises en suspension dans du PBS et la fluorescence de l'anticorps secondaire est lue par le cytomètre en flux.

2.2.7. Analyse par microscopie optique

- **Prolifération cellulaire**

Afin d'étudier la prolifération cellulaire, les cellules de la lignée JEG-3 et de la lignée HaCat sont ensemencées en plaque 48 puits à 50 000 cellules / mL dans du milieu de culture contenant 10% de SVF. Chaque jour, un puits de cellules par condition est décollé par de la trypsine puis les cellules sont comptées à l'aide d'un hématimètre (cellule de Thoma) pendant 4 jours. La concentration cellulaire (cellules / mL) est obtenue en multipliant la moyenne des deux cadrans par un facteur de 10^4.

- **Migration cellulaire**

Les cellules de la lignée JEG-3 sont ensemencées en plaque 6 puits à 120 000 cellules / mL dans du milieu de culture. 24 heures plus tard, lorsque les cellules sont à confluence, une plaie est réalisée à l'aide d'un cône de pipette sur le tapis cellulaire (Jour 0). Les débris cellulaires sont alors éliminés par rinçage au PBS puis les cellules sont incubées avec les produits à tester le temps voulu. Les tapis cellulaires sont ensuite étudiés après 72 heures d'incubation (Jour 3). La surface des plaies est analysée par le logiciel Image J qui permet une

quantification en unités arbitraires. Le ratio de la surface de plaie observée au Jour 0 sur celle observée au Jour 3 correspond au facteur de migration des cellules.

2.2.8. Analyse par microscopie confocale de fluorescence

2.2.8.1. Principe de la microscopie confocale de fluorescence

En microscopie classique à épifluorescence, un des problèmes majeurs est la présence d'un bruit de fond important lié à l'épaisseur de l'objet observé. Bien que la mise au point se fasse sur un plan focal bien précis, l'enregistrement de l'information est entaché par un bruit de fond qui se superposer à l'image du plan observé : ce bruit résulte de l'excitation par la source lumineuse de tous les fluorochromes situés sur le trajet lumineux. Le microscope confocal agit comme un microscope optique. Son principe consiste à focaliser, par l'intermédiaire d'un pinhole, un faisceau laser qui excite les fluorochromes en un point de l'échantillon, puis à récupérer sur un photomultiplicateur le signal lumineux émis en ce point. Un diaphragme qui arrête tout signal ne provenant pas du plan focal est placé devant le photomultiplicateur. Le signal reçu est amplifié dans le photomultiplicateur, traité afin d'améliorer le rapport signal / bruit, puis numérisé. L'image est construite point par point par balayage X, Y du champ analysé à l'aide de miroirs de déflexion de la source lumineuse. Le déplacement de la préparation selon l'axe Z permet la saisie de différents plans optiques dans l'épaisseur de l'échantillon.

2.2.8.2. Préparation des cellules

Les cellules de la lignée JEG-3 sont ensemencées à 80 000 cellules / mL à raison de 200µL dans les chambres de Lab-Tek^{TM} 8 puits. Les Lab-Tek^{TM} sont des lamelles traitées pour la culture cellulaire et compartimentées permettant une analyse microscopie spécialement adaptée à la culture cellulaire. Leurs puits sont amovibles, permettant une incubation des cellules avec les produits à tester directement sur les lames de microscope.

2.2.8.3. Tests réalisés en microscopie confocale de fluorescence

Après ensemencement, les cellules sont placées durant 24 heures à l'incubateur thermostaté à 37°C sous une atmosphère contrôlée à saturée en humidité et à 5% de CO_2.

Après 24 heures, les cellules ont adhéré au fond des Lab-tek^{TM} et peuvent être incubées avec les produits à tester. Le milieu de culture est alors éliminé par retournement de la Lab-tek^{TM}, les cellules sont rincées au tampon PBS pour éliminer les débris cellulaires et les produits à tester sont distribués dans les puits de la microplaque, à raison de 200µL par puits.

- **Evaluation de l'expression de la protéine ZO-1 et du récepteur P2X7**

Après élimination des produits à tester et rinçage des cellules au PBS, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 2% contenant 2mM de calcium durant 20 minutes puis perméabilisées par du triton à 0,2% dans du PBS pendant 20 minutes. Les cellules sont ensuite incubées pendant une heure avec l'anticorps primaire, soit un anticorps de lapin dirigé contre le récepteur P2X7 (Santa cruz) dilué au 1/50, soit un anticorps de lapin dirigé contre la protéine ZO-1 (Zymed Laboratories) dilué au 1/100, dans du PBS contenant 1% de BSA. Les cellules sont par la suite incubées avec un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les anticorps de lapin et dilué au 1/125 dans la solution de PBS + BSA à 1% pendant 1 heure. Les noyaux sont par la suite marqué par une incubation des cellules pendant 10 minutes avec du TO-PRO-3 dilué au 1/500 dans la solution de PBS + BSA à 1%. Les cases de la Lab-tek^{TM} sont alors retirées, une goutte de milieu de montage Vectashield est déposée dans chaque puits et le montage est complété par l'ajout d'une lamelle de verre scellée par du vernis. Une fois le montage terminé, les cellules sont observées au microscope confocal.

- **Evaluation de l'expression des phosphatidylsérines dans le feuillet externe de la membrane plasmique**

Après élimination des produits à tester et rinçage des cellules au PBS, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 2% contenant 2mM de calcium durant 20 minutes. Les cellules sont ensuite incubées pendant une heure avec de l'annexine V diluée au 1/10 dans du PBS. Les cases de la Lab-tek^{TM} sont alors retirées, une goutte de milieu de montage Vectashield est déposée dans chaque puits et le montage est complété par l'ajout d'une lamelle de verre scellée par du vernis. Une fois le montage terminé, les cellules sont observées au microscope confocal.

2.2.9. Analyse par spectrométrie de masse

Le dosage du BaP et la recherche de certains de ses métabolites a été réalisée en spectrométrie de masse. Pour cela, les cellules à confluence en flasque ont été incubées avec le BaP puis rincées, décollées par 3mL de trypsine et collectées. Les culots cellulaires sont rincés deux fois au PBS, remis en suspension dans 1mL d'eau et 50µL d'étalon interne à 5µM puis soniqués pendant 5 minutes à 4°C. Les homogénats cellulaires sont extraits deux fois par 2mL de dichlorométhane puis 2mL d'acétate d'éthyle. Après évaporation du solvant, les extraits secs sont remis en solution dans 100µL d'un mélange de méthanol et d'acétonitrile (1 :1, v/v) et 5µL sont injectés dans le système UPLC-APPI-MS.

Les surnageants cellulaires sont également utilisés pour la détection du BaP. 50µL d'étalon interne à 50mM sont ajoutés aux surnageants puis ces derniers sont extraits deux fois dans 2mL de dichlorométhane puis 2mL d'éthyle acétate. Les extraits secs sont alors remis en suspension dans 100µL d'un mélange de méthanol et d'acétonitrile (1:1, v/v) et 5µL sont injectés dans le système UPLC-APPI-MS. Pour l'identification des métabolites du BaP dans les surnageants, 10mL de surnageant ont été extraits par 40mL de solvants organiques suivant le même protocole.

Tous les échantillons sont analysés par chromatographie liquide ultra haute performance à polarité de phase inversée (ACQUITY UPLC®, Waters) couplée à un spectromètre de masse hybride quadrupôle teps de vol orthogonal (SYNAPT® G2 haute définition, Waters) équipé d'une source de photoionisation à pression atmosphérique (APPI) fonctionnant en mode d'ionisation positif. Le nom entier de l'appareillage est résumé sous le terme UPLC-APPI-MS. La séparation chromatographique du BaP et de ses métabolites a été réalisée en gradient d'élution sur une colonne CSH C18 de 1,8µm (2,1 x 100mm) thermostastée à 25°C en utilisant comme phase mobile un mélange d'acide formique 0,01% dans l'eau et d'acétonitrile à un débit de 0,4mL/minute. Pour la quantification du BaP, la chromatographie a été réalisée en élution isocratique à l'aide d'une phase mobile constituée d'un mélange d'acide formique 0,01 % dans l'eau et d'acétonitrile 15/85 (v/v) pendant 5 minutes. L'identification des métabolites du BaP est effectuée en gradient d'élution à l'aide d'un mélange 0,01 % dans l'eau et d'acétonitrile. Une seconde pompe (LC-20AD, Shimadzu, Japan) est utilisée pour distribuer à un débit de 0,05mL/minute un mélange d'anisole et de

toluène (1:1, v/v), utilisé comme dopant ionisant. La source APPI (IonSABRE™ APPI-APCI-Dual-Mode Ionization Source, Waters) est utilisée avec une lampe à UV à décharge de 10eV de krypton. Les paramètres de la source d'ionisation utilisés sont les suivants : température de la source 120°C, température de désolvatation 400°C, débit de gaz dans le cône 20 L/h, débit de gaz de désolvatation 900 L/h, tension du cône d'extraction 4 V, tension du cône d'échantillonnage 35 V, tension du transfert de la source APPI 1 kV. Les spectres de masse haute résolution sont acquis dans une gamme de m/z allant de 50 à 1000 avec un temps de balayage de 0,1 seconde et un intervalle de balayage de 0,01 seconde, en utilisant une résolution de masse cible de 21500 (FWHM défini pour m/Z = 500).

3. RESULTATS

Dans toutes nos expériences, le BaP est solubilisé dans du DMSO à 40mM ; cette solution mère est utilisée pour réaliser les gammes de dilutions. La concentration finale maximale en DMSO sur les cellules est de 0,025%. Aucune différence significative entre le DMSO à 0,025% et le contrôle négatif correspondant au milieu de culture ayant servi à diluer les micropolluants à tester (« negative control » dans les graphes) n'étant mise en évidence pour tous les tests effectués, la condition DMSO n'apparaitra pas sur les figures par la suite.

Sélection du modèle d'étude placentaire : culture primaire versus lignées cellulaires (BeWo et JEG-3)

3.1. SELECTION DU MODELE D'ETUDE PLACENTAIRE

- **Objectif**

Le but de notre travail est dans un premier temps de **sélectionner un modèle d'étude de cellules placentaires** adapté à l'étude de la toxicité induite par des micropolluants.

- **Approche expérimentale**

Nous avons étudié la cytotoxicité induite par le BaP sur différents modèles placentaires, la culture primaire de trophoblastes, la lignée cellulaire de trophoblastes BeWo et la lignée de trophoblastes JEG-3, par un test de viabilité cellulaire en microplaque, l'analyse du pic SubG1 en cytométrie en flux et une observation microscopique des tapis cellulaires à confluence.

➢ CULTURE PRIMAIRE DE TROPHOBLASTES

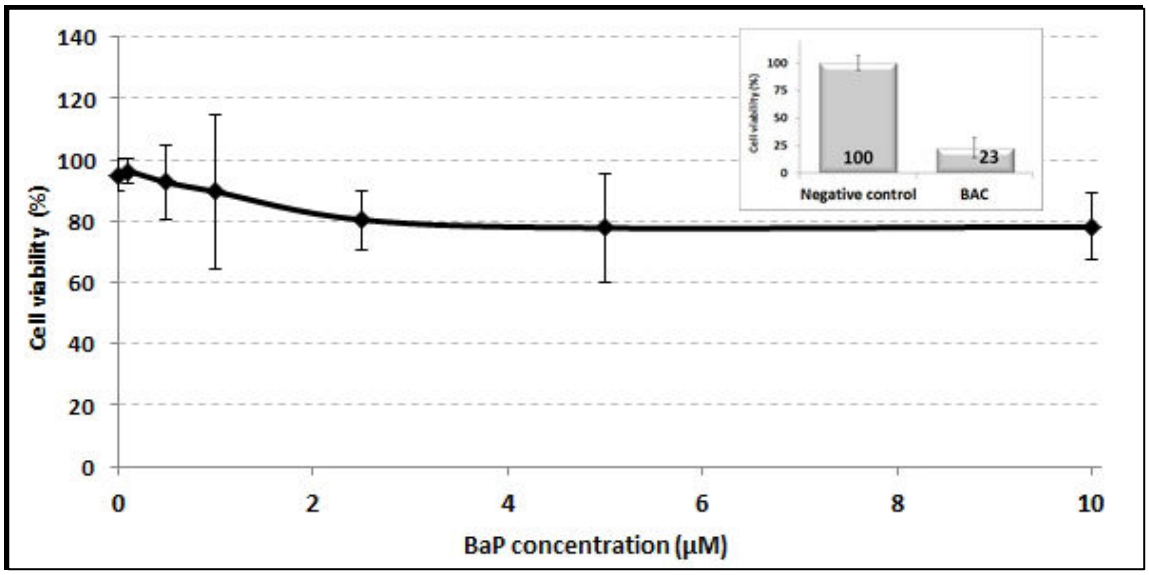


Figure 21. Viabilité cellulaire. Les cellules sont incubées pendant 48 heures avec une gamme de concentrations de BaP ou du chlorure de benzalkonium (BAC) à 0,005µM puis la viabilité cellulaire est évaluée par un test au rouge neutre en microtitration cytofluorimétrique. *** $p < 0.001$ vs negative control

La viabilité cellulaire est fixée à 100% en absence de BaP. Le témoin positif de mort cellulaire que nous avons choisi (le conservateur chlorure de benzalkonium BAC) induit une perte conséquente de viabilité cellulaire. A l'inverse, le BaP n'induit aucune perte de viabilité après 48 heures d'incubation sur les cultures primaires de trophoblastes jusqu'à 10µM. Nous avons choisi d'étudier trois concentrations de BaP éloignées les unes des autres d'un facteur 10 afin de couvrir une large gamme de concentrations.

Afin d'étudier plus en détail d'éventuels effets apoptotiques du BaP qui ne sont pas mis en évidence par un test de viabilité cellulaire, nous nous sommes intéressée à une étape irréversible de l'apoptose, la fragmentation de l'ADN, *via* l'analyse du pic SubG1.

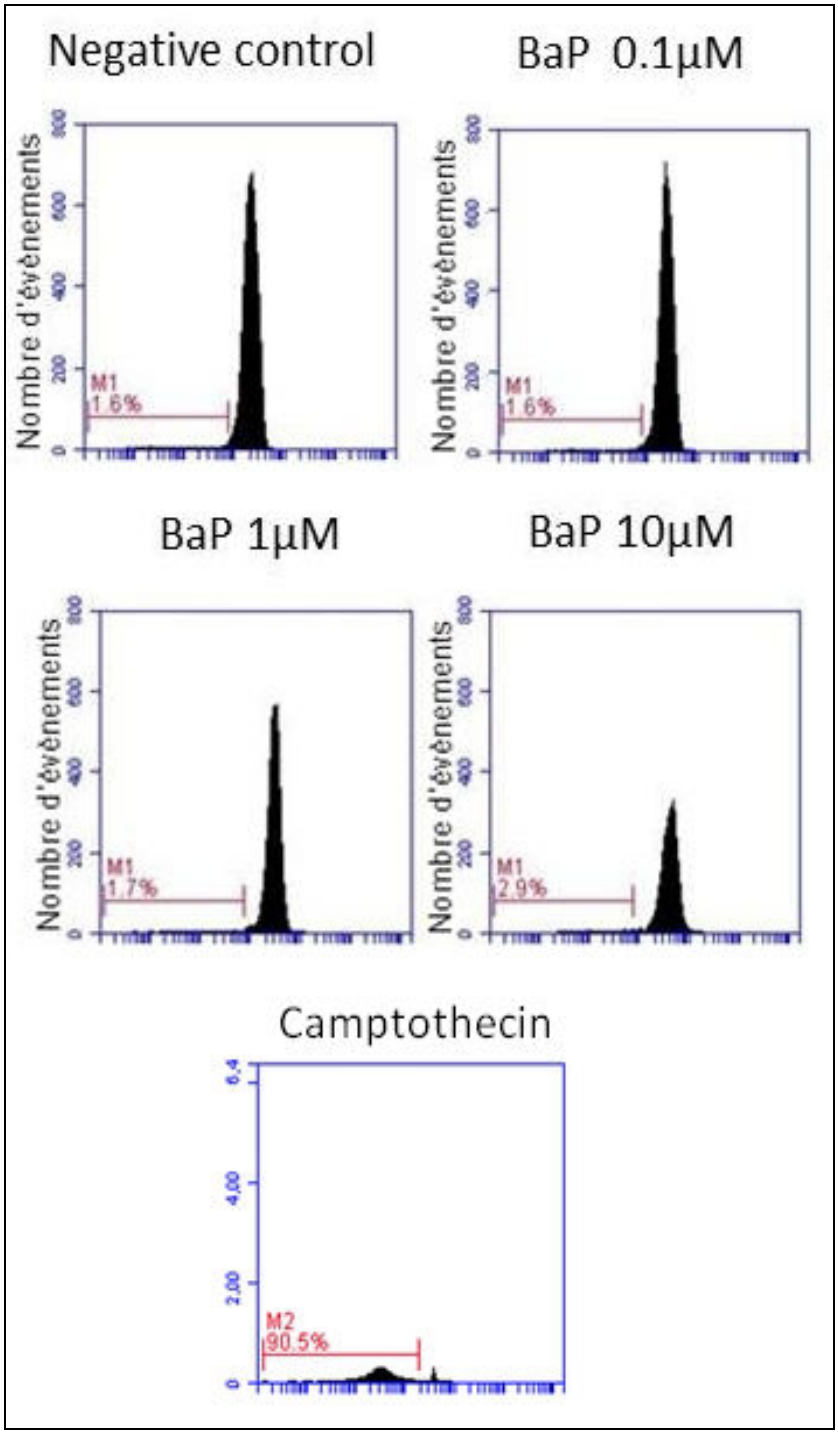


Figure 22. Analyse du pic SubG1. Les cellules sont incubées pendant 48 heures avec du BaP ou de la camptothécine 10µM puis l'ADN des cellules est marqué à l'iodure de propidium et les cellules sont analysées en cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules en SubG1 est déterminé par le pourcentage de cellules détectées sous le trait rouge Ces résultats sont représentatifs de 2 expérimentations.

Le BaP n'induit pas l'apparition d'un pic subG1 après 48 heures d'incubation et ne semble donc pas induire de mécanisme apoptotique. Après incubation avec la camptothécine, 90,5% de la population cellulaire ont leur ADN fragmenté.

Les cultures primaires de trophoblastes semblent être un modèle pertinent et intéressant puisqu'il répond aux agents toxiques testés (BAC et camptothécine) et ces cellules montrent des réponses cellulaires différentes de celles auxquelles nous pouvions nous attendre avec le BaP. En effet, dans la littérature, il apparait que le BaP induit la mort cellulaire aux concentrations que nous avons testées sur d'autres modèles cellulaires (Chang et al. 2007). Bien que les cultures primaires de trophoblastes pourraient être intéressantes pour étudier les effets toxiques de micropolluants, les difficultés d'obtention hospitalière de placentas et donc de cultures primaires de trophoblastes rendent difficile l'utilisation de ce modèle cellulaire en routine. De plus, il faut également prendre en compte la variabilité interindividuelle qui peut influencer l'obtention de résultats reproductibles pour la suite des expériences. Un autre paramètre important à prendre en compte est le fait que nous voulons mettre en évidence des biomarqueurs induits par le BaP et le DEHP à des temps longs, pour se rapprocher au mieux d'une exposition chronique. Or, les cultures primaires de trophoblastes tendent à dégénérer rapidement, environ 72h après isolement. Notre intérêt s'est alors porté sur un autre modèle placentaire, la lignée de cellules BeWo, que nous avons exposée aux micropolluants durant un temps d'incubation plus long que les cultures primaires de trophoblastes.

➢ LIGNEE DE TROPHOBLASTES BeWo

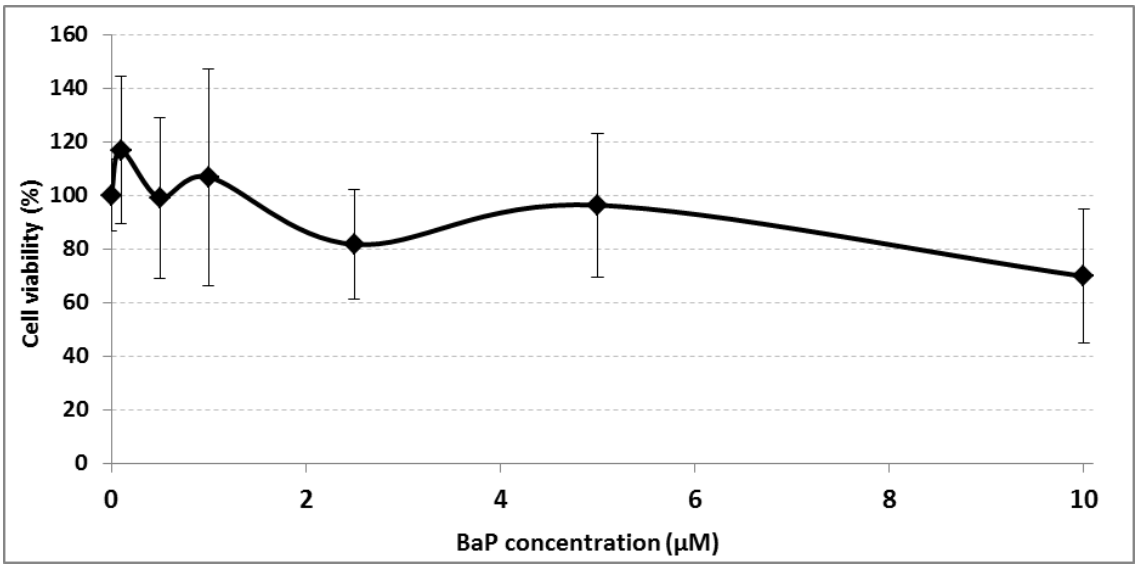


Figure 23. Viabilité cellulaire. Les cellules sont incubées pendant 72 heures avec une gamme de concentration de BaP puis la viabilité cellulaire est évaluée par un test au rouge neutre en microtitration cytofluorimétrique.

Après 72 heures d'incubation, le BaP ne semble induire aucune cytotoxicité significative. Cependant, la grande variabilité existant au sein de chaque condition rend difficile une analyse statistique correcte.

Afin de déterminer si cet effet de mauvaise reproductibilité est dû au micropolluant BaP ou au modèle cellulaire utilisé, nous avons incubé cette lignée avec un autre micropolluant d'intérêt, le DEHP.

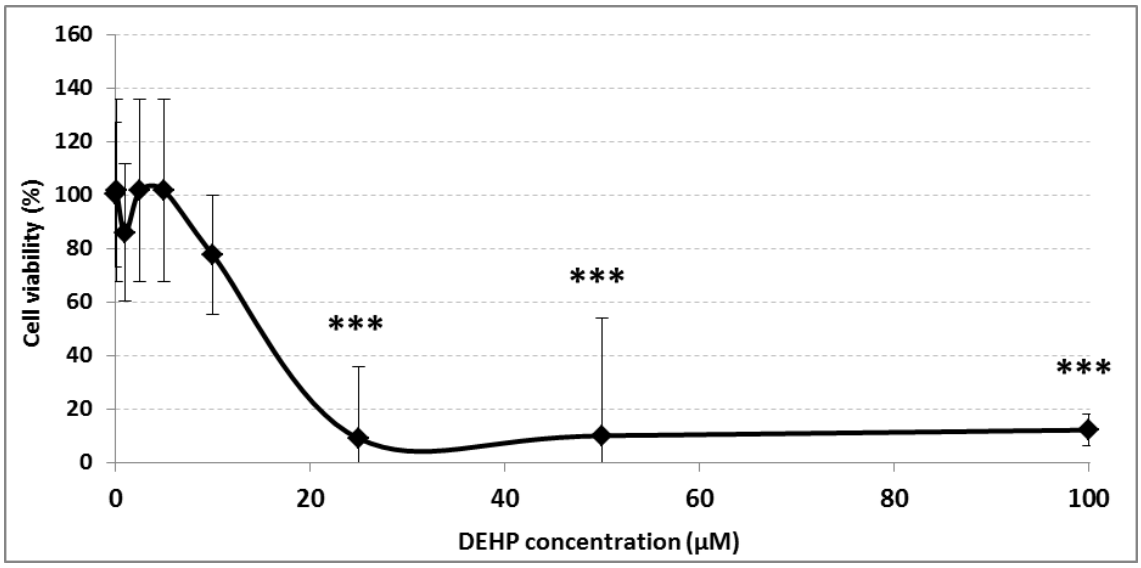


Figure 24. Viabilité cellulaire. Les cellules sont incubées pendant 72 heures avec une gamme de concentrations de DEHP puis la viabilité cellulaire est évaluée par un test au rouge neutre en microtitration cytofluorimétrique. *** $p < 0.001$ vs 0µM de DEHP.

Après 72 heures d'incubation, le DEHP induit une perte de viabilité significative à partir de 25µM. Cependant, là encore, la grande variabilité existant au sein de chaque condition rend difficile une analyse statistique correcte pour les concentrations inférieures à 25µM.

Afin de mieux comprendre cette forte variabilité, nous avons observé les tapis cellulaires au microscope à chaque étape de l'expérimentation.

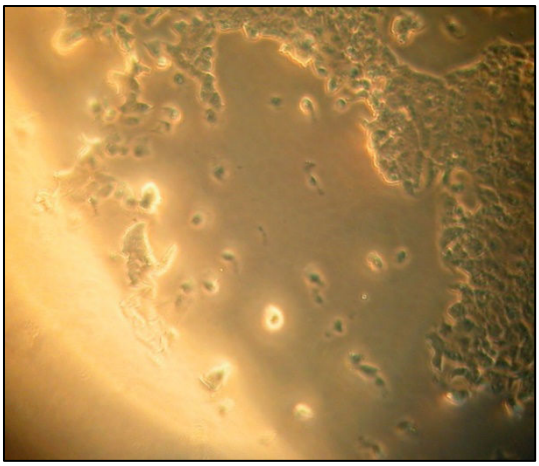


Figure 25. Tapis cellulaire de cellules BeWo décollées observé en microscopie optique après le second rinçage au PBS du test au Rouge neutre (x100). Ce tapis cellulaire n'est incubé avec aucun micropolluant.

Il apparait que le tapis cellulaire de BeWo à confluence, qu'il soit incubé ou non avec le micropolluant, se décolle lors des différentes étapes de rinçage et de dépôt de sonde du test au rouge neutre. En effet, le tapis cellulaire est encore à confluence lorsque le produit à tester est éliminé par retournement de la microplaque mais les cellules se décollent lors de l'ajout de la sonde rouge neutre et les rinçages au PBS (Figure 25). Cette observation expliquerait ainsi la faible reproductivité entre les différents puits d'une même condition et ainsi la grande variabilité des résultats obtenus.

Du fait de la forte variabilité des résultats observée, la lignée cellulaire BeWo qui est couramment utilisée pour les études de physiologie placentaire ne semble pas facilement utilisable en routine pour les tests de toxicologie qui se font principalement en microplaque. Nous avons donc comparé les tapis cellulaires de la lignée JEG-3 aux BeWo.

➢ LIGNEE DE TROPHOBLASTES JEG-3

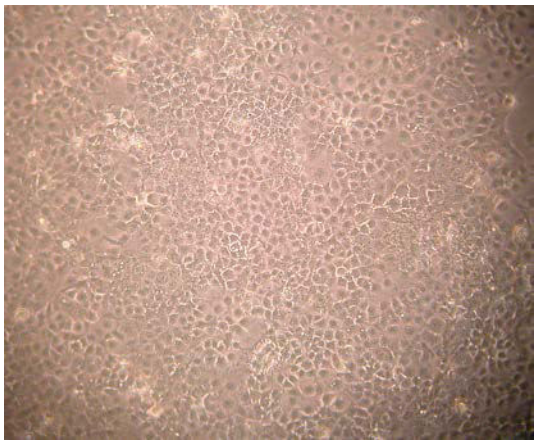


Figure 26. Tapis cellulaire de cellules JEG-3 observé en microscopie optique après le second rinçage au PBS du test au Rouge neutre (x100). Ce tapis cellulaire n'est incubé avec aucun micropolluant.

Après observation microscopique, les cellules JEG-3 ne se décollent pas après rinçage au PBS lors de la réalisation des tests de viabilité, à l'inverse des cellules de la lignée BeWo.

- **Discussion**

Les cultures primaires sont difficiles à récupérer car leur obtention est dépendante des services hospitaliers. Elles permettent difficilement d'obtenir des résultats reproductibles du fait de la variabilité interindividuelle et ne peuvent être en contact avec les produits à tester que durant 48 heures maximum ; elles ne nous semblent donc pas un modèle facilement utilisable pour l'étude de la cytotoxicité de micropolluants chroniques. La lignée de trophoblastes BeWo est couramment utilisée dans les études de physiologie placentaire mais elle ne semble pas être adaptée aux tests en microplaque. Or, la majorité des études de toxicologie se faisant sur ce type de support, cette lignée ne semble pas adaptée à nos études. Etant donné que les cellules de la lignée JEG-3 ne se décollent pas en microplaque, nous avons réalisé la suite de nos travaux sur cette lignée de trophoblastes.

Recherche sur le micropolluant DEHP et son métabolite le MEHP

3.2. ETUDE DES EFFETS DU DEHP ET DE SON METABOLITE LE MEHP SUR LE PLACENTA : TROPHOBLASTES ET MACROPHAGES

3.2.1 Etude des effets du DEHP et de son métabolite le MEHP sur la lignée placentaire JEG-3

- **Objectif**

L'objectif de cette partie est d'étudier la toxicité cellulaire du DEHP et de son métabolite le MEHP sur notre modèle de cellules placentaires trophoblastiques. Nous nous proposons d'étudier les perturbations endocriniennes par le dosage de deux hormones placentaires, l'hCG hyperglycosylée et l'hPL, mais aussi les mécanismes d'action toxiques notamment en termes d'altérations mitochondriales et de marqueurs d'apoptose, ainsi que l'étude d'un biomarqueur de dégénérescence, le récepteur P2X7.

- **Approche expérimentale**

➢ **<u>Effet cytotoxique du DEHP</u>**

Dans un premier temps, nous avons étudié la viabilité cellulaire de la lignée JEG-3 après incubation avec le DEHP.

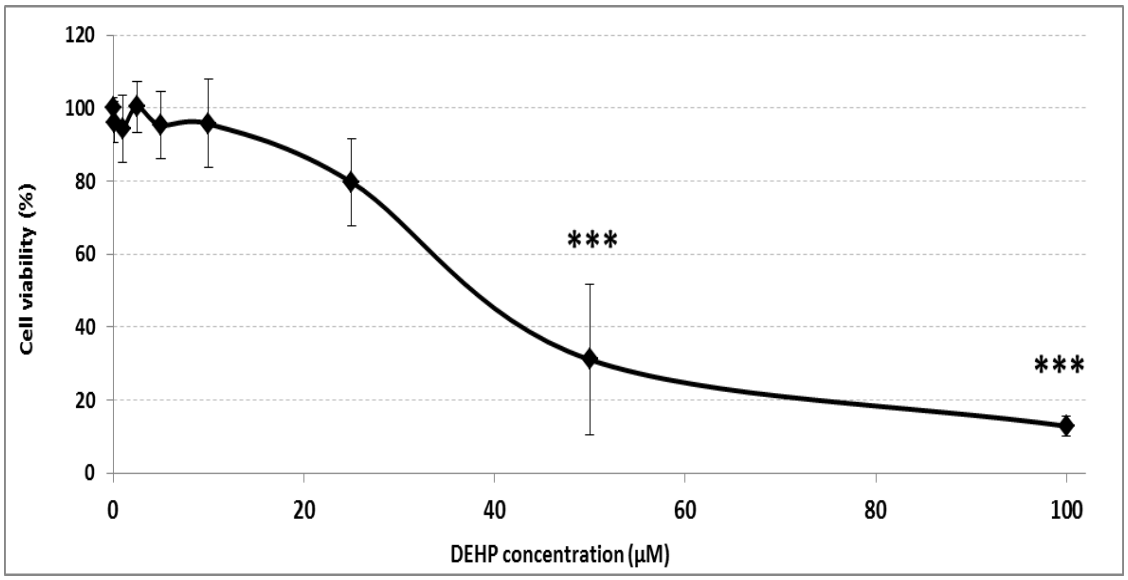


Figure 27. Viabilité cellulaire. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec une gamme de concentrations de DEHP puis la viabilité cellulaire est évaluée par un test au rouge neutre en microtitration cytofluorimétrique *** $p < 0.001$ vs 0µM de DEHP.

Le DEHP induit une perte de viabilité significative à partir de 50µM après 72 heures d'incubation. Ainsi, étant donné que le DEHP a un effet cytotoxique et que la littérature décrit qu'il exerce ses effets par l'action de ses métabolites, cela laisse penser qu'il est métabolisé par notre modèle. De plus, la variabilité au sein d'une même condition, représentée par la hauteur des barres d'erreur, est beaucoup moins importante en utilisant ce modèle cellulaire plutôt que les modèles précédents, ce qui nous conforte dans l'idée que notre modèle cellulaire pourrait être un modèle d'étude pertinent. Nos objectifs étant de mettre en évidence des biomarqueurs de perturbation endocrinienne et de dégénérescence sur un modèle *in vitro*, il nous parait important de maximiser les effets que l'on pourrait observer en incubant les cellules non pas directement avec du DEHP mais avec son métabolite le plus toxique, le MEHP.

- **Effet cytotoxique du MEHP**

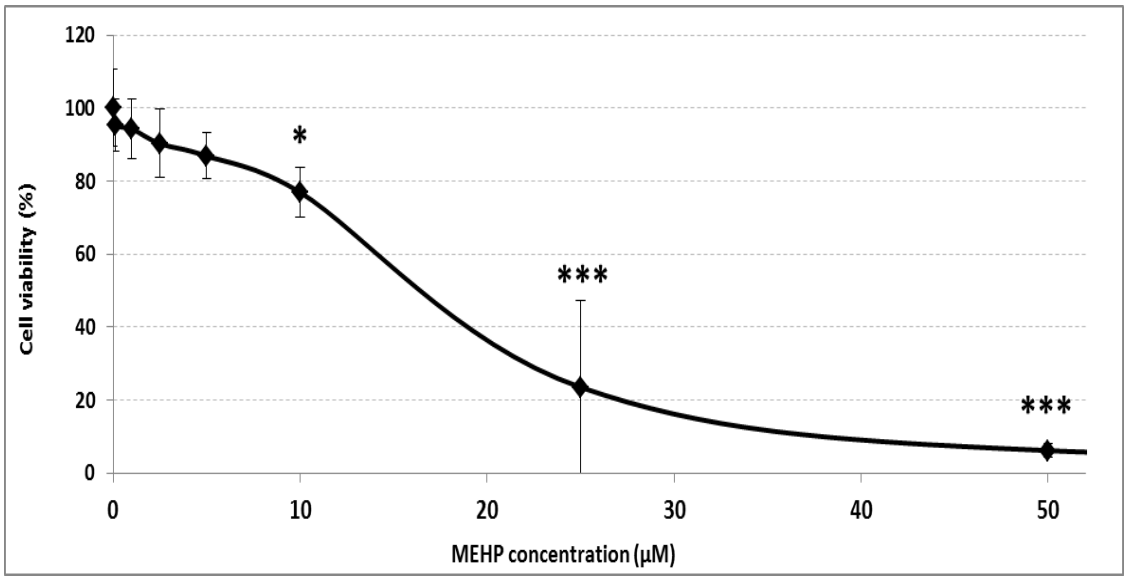


Figure 28. Viabilité cellulaire. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec une gamme de concentrations de MEHP puis la viabilité cellulaire est évaluée par un test au rouge neutre en microtitration cytofluorimétrique.* $p < 0,01$, *** $p < 0.001$ vs 0µM de MEHP.

Le MEHP induit une perte de viabilité significative à partir de 25µM après 72 heures d'incubation. En toxicologie pour l'étude des dispositifs médicaux, on se réfère souvent à la norme ISO 10993-5 qui définit qu'un produit est cytotoxique lorsqu'il induit une perte de viabilité de 30% ou plus. Ainsi, bien que la perte de viabilité de 20% observée à 10µM de MEHP soit statistiquement significative, cette concentration n'est pas cytotoxique au sens strict du terme. Pour la suite de notre étude, nous incuberons les cellules aux concentrations de MEHP suivantes : 1µM, 5µM et 10µM.

- **Activation du récepteur PPARγ**

Afin de valider la réponse cellulaire de notre modèle d'étude au MEHP, nous nous sommes basée sur la littérature qui décrit que le MEHP est un ligand exogène du récepteur

PPARγ qu'il est capable d'activer et avons donc étudié l'activation de ce récepteur par le MEHP.

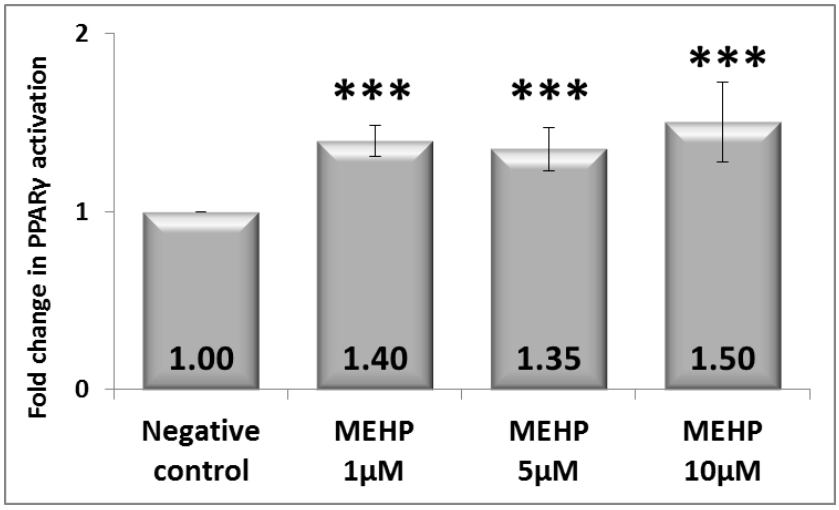


Figure 29. Activation du récepteur PPARγ. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 24 heures avec du MEHP. L'activation du récepteur PPARγ est mesurée par technique ELISA sur les extraits nucléaires préalablement isolés. *** $p < 0.001$ vs negative control.

Dès la plus faible concentration, le MEHP induit l'activation du récepteur PPARγ. Ainsi, notre modèle cellulaire semble fonctionnel et adapté à l'étude des effets du MEHP.

Le MEHP étant un PE et la lignée de cellules JEG-3 ayant une fonction de sécrétion hormonale, nous nous intéresserons à mettre au point des tests permettant de détecter une perturbation hormonale induite par le MEHP.

- **<u>Evaluation de la sécrétion hormonale</u>**

Le MEHP étant classé comme PE avéré, nous avons voulu évaluer par des tests *in vitro* différents de ceux classiquement utilisés cette perturbation endocrinienne, et ce dans le but d'élargir le panel de tests déjà existants. Pour cela, nous avons étudié la sécrétion d'hCG hyperglycosylée et d'hPL induites par le MEHP sur notre modèle cellulaire de trophoblastes après 72 heures d'incubation.

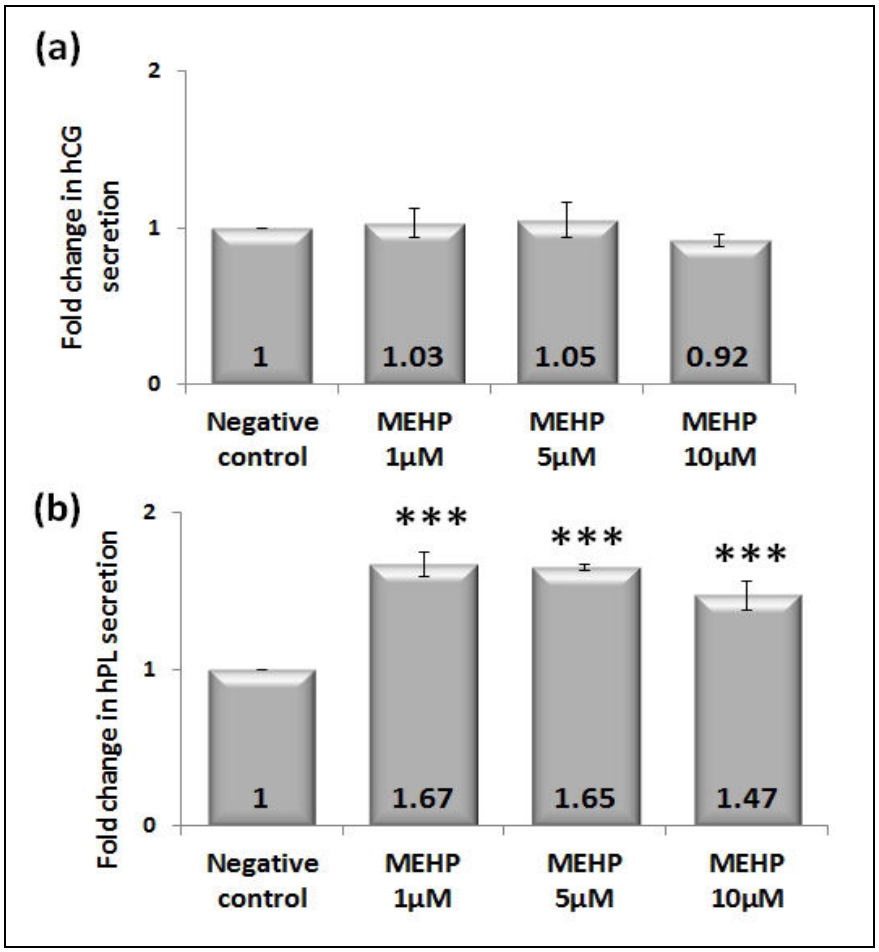


Figure 30. Sécrétion hormonale induite par le MEHP. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du MEHP. La sécrétion d'hCG hyperglycosylée (a) et d'hPL (b) est mesurée dans les surnageants cellulaires par la technique ELISA.

*** $p < 0.001$ vs negative control.

Le MEHP n'induit aucune modification de la sécrétion d'hCG hyperglycosylée mais augmente fortement la sécrétion d'hPL quelle que soit la concentration testée. Le dosage de ces hormones semble donc intéressant pour l'identification de PE.

Afin de valider l'intérêt du dosage de ces hormones dans le cas de la détection de PE, nous avons voulu étudier la sécrétion de l'hCG hyperglycosylée et de l'hPL après incubation des cellules trophoblastiques avec une autre molécule décrite dans la littérature comme un PE et classée en tant que tel par l'Union Européenne, le bisphénol A.

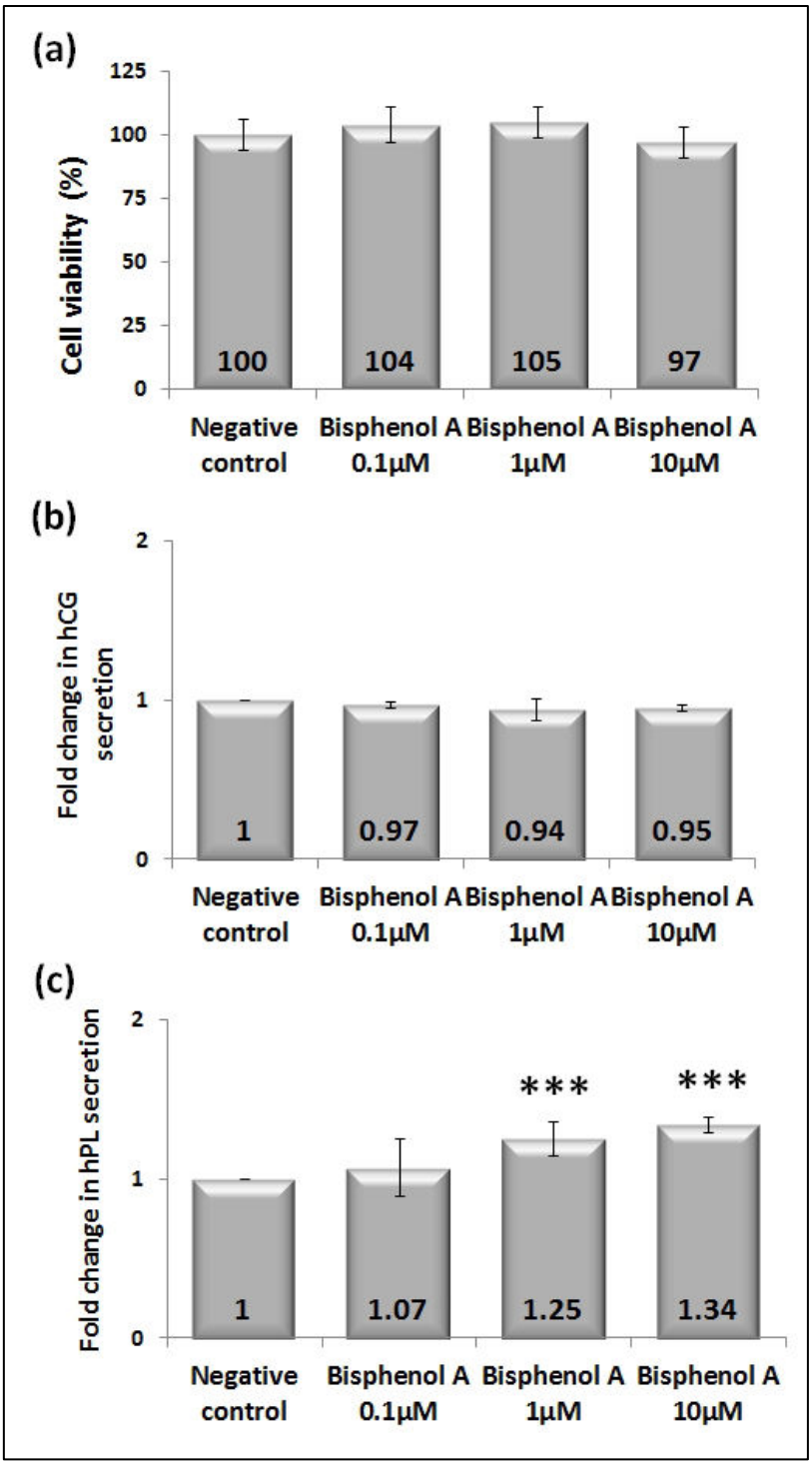


Figure 31. Viabilité cellulaire et sécrétion hormonale induite par le bisphénol A. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec une gamme de concentrations en bisphénol A. La viabilité cellulaire (a) est mesurée par le test au rouge neutre en microtitration cytofluorimétrique ; la sécrétion d'hCG hyperglycosylée (b) et d'hPL (c) est évaluée dans les surnageants cellulaires par la technique ELISA. *** $p < 0.001$ vs negative control.

Le bisphénol A n'induit aucune perte de viabilité jusqu'à 10µM. De plus, il n'entraîne aucun changement dans la sécrétion d'hCG hyperglycosylée mais augmente significativement la sécrétion d'hPL. Nous observons le même profil hormonologique quel que soit le PE étudié ; ces résultats confirment donc l'intérêt du dosage de ces deux hormones placentaires *in vitro* sur lignée cellulaire de placenta pour évaluer la perturbation endocrinienne induite par des PE.

Par la suite, nous avons voulu savoir si la sécrétion de ces deux hormones placentaires pouvait être induite par les œstrogènes ou les androgènes. A cette fin, nous avons évalué la modification de sécrétion hormonale après incubation des cellules avec de la testostérone ou du 17β-œstradiol.

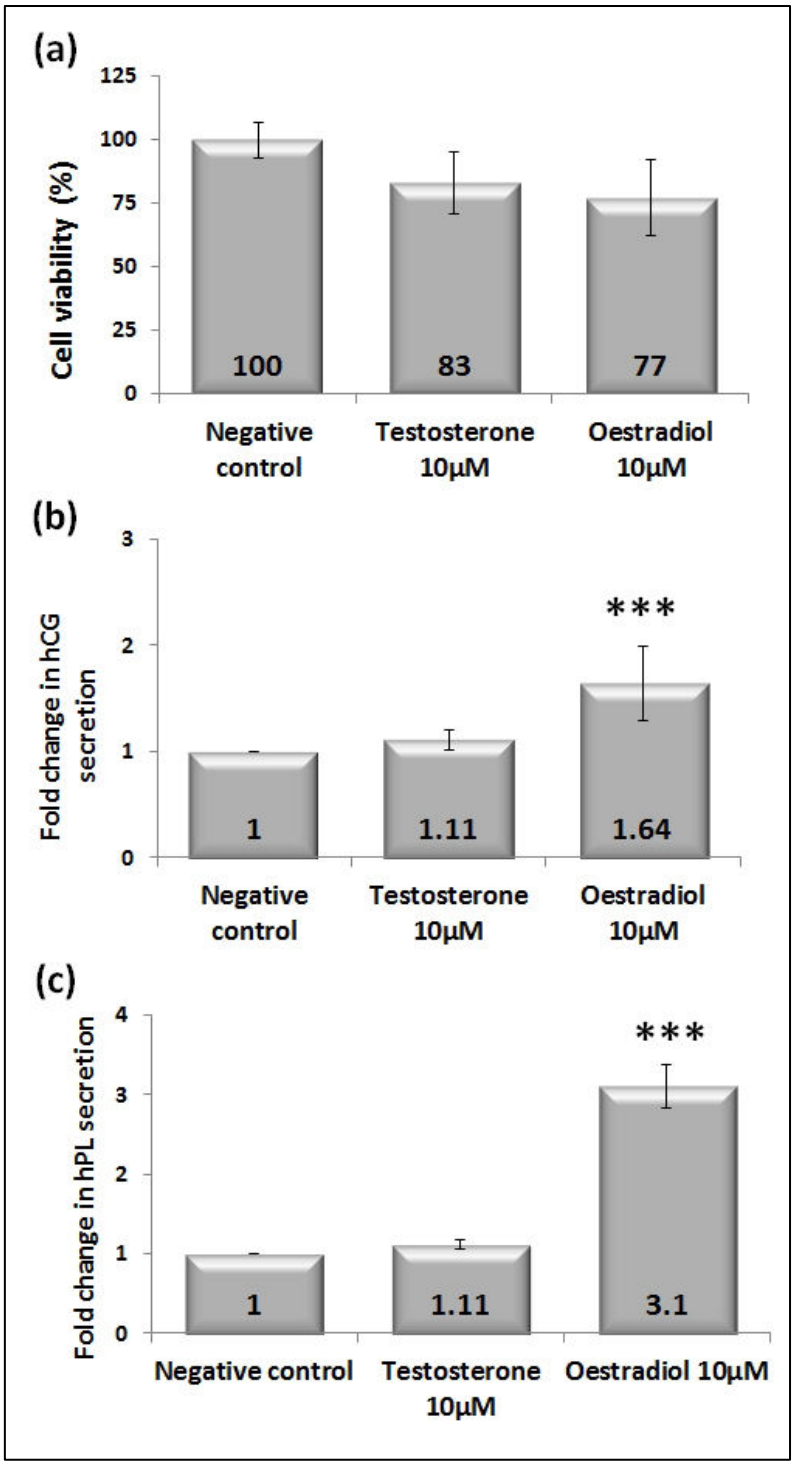


Figure 32. Viabilité cellulaire et sécrétion hormonale induite par la testostérone et le 17β-œstradiol. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec de la testostérone (10µM) ou du 17β-œstradiol (10µM). La viabilité cellulaire (a) est mesurée par le test au rouge neutre en microtitration cytofluorimétrique; la sécrétion d'hCG (b) et d'hPL (c) est évaluée dans les surnageants cellulaires par la technique ELISA. *** $p < 0.001$ vs negative control.

Ni la testostérone, ni le 17β-œstradiol n'induisent de perte de viabilité significative aux concentrations testées. La testostérone n'entraine aucune modification de la sécrétion d'hCG hyperglycosylée ou d'hPL, à l'inverse du 17β-œstradiol qui les augmente significativement et fortement. Ainsi, la sécrétion de ces deux hormones placentaires est induite par un œstrogène mais pas par l'androgène testé dans nos conditions.

Le MEHP est souvent associé dans la littérature à des altérations mitochondriales. Dans un autre volet de notre travail, notre objectif est donc d'étudier ces altérations sur le modèle cellulaire placentaire JEG-3.

- **<u>Etude des altérations mitochondriales</u>**

Les altérations mitochondriales sont entre autres caractérisées par une modification du potentiel transmembranaire, de la masse mitochondriale et de l'activité de la succinate déshydrogénase appartenant à la chaîne respiratoire mitochondriale. Nous avons donc évalué ces paramètres dans la suite de notre étude.

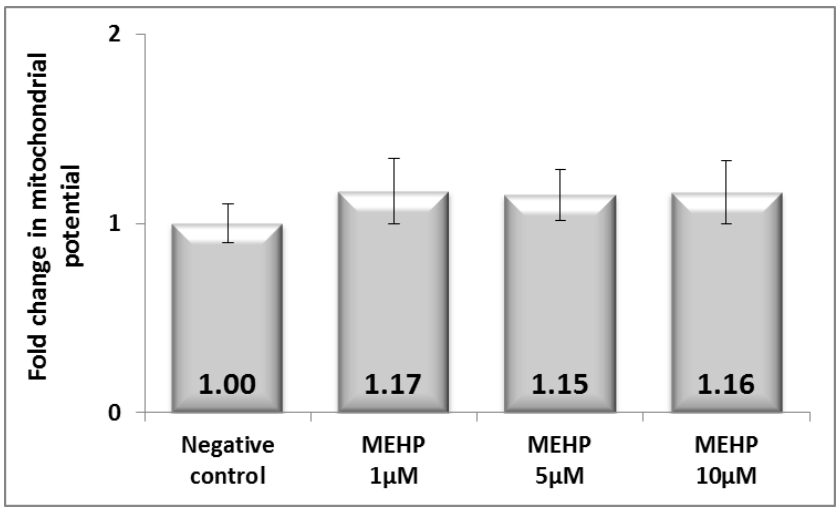


Figure 33. Potentiel transmembranaire mitochondrial. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du MEHP puis le potentiel transmembranaire mitochondrial est mesuré par la sonde rhodamine 123 en microtitration cytofluorimétrique.

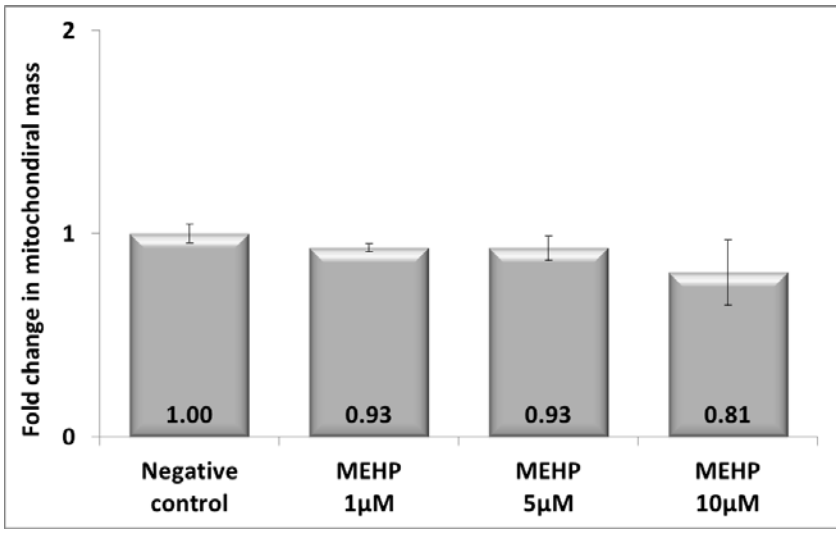


Figure 34. Masse mitochondriale. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du MEHP puis la masse mitochondriale est mesurée par la sonde NAO en microtitration cytofluorimétrique.

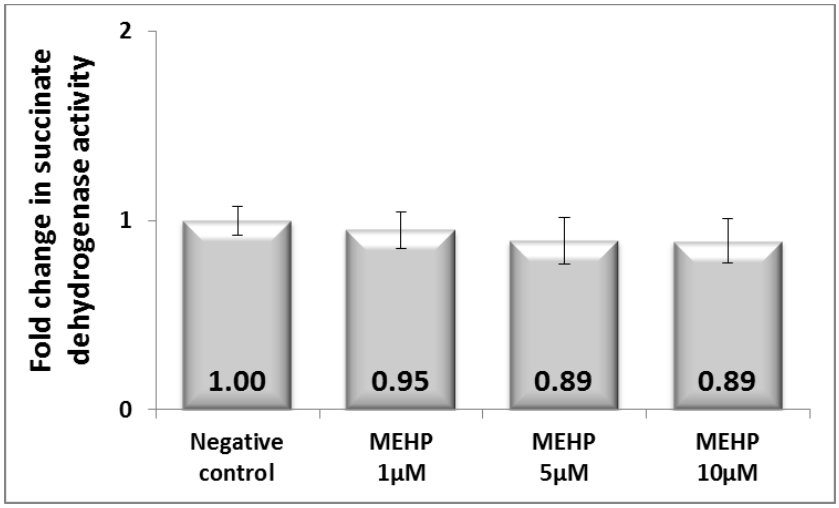


Figure 35. Activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du MEHP puis l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale est mesurée par le test colorimétrique au MTT.

Aucun changement dans le potentiel transmembranaire mitochondrial, la masse mitochondriale ou l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondrial n'est observé après incubation avec le MEHP. Ainsi, nous ne mettons pas en avant d'altération mitochondriale induite par le MEHP, ce qui sous entendrait que les cellules placentaires

présentent des réponses cellulaires spécifiques différentes de celles observées sur d'autres types cellulaires.

Le MEHP n'induisant aucune perte de viabilité ni d'altération mitochondriale aux concentrations testées, notre intérêt s'est alors porté sur les mécanismes apoptotiques éventuellement induits par le MEHP aux concentrations subtoxiques.

- **<u>Mécanismes apoptotiques</u>**

L'apoptose est caractérisée entre autre par le clivage de pro-caspases en caspases, ce qui a pour fonction de les activer, et d'aboutir à la condensation de la chromatine qui est une étape irréversible.

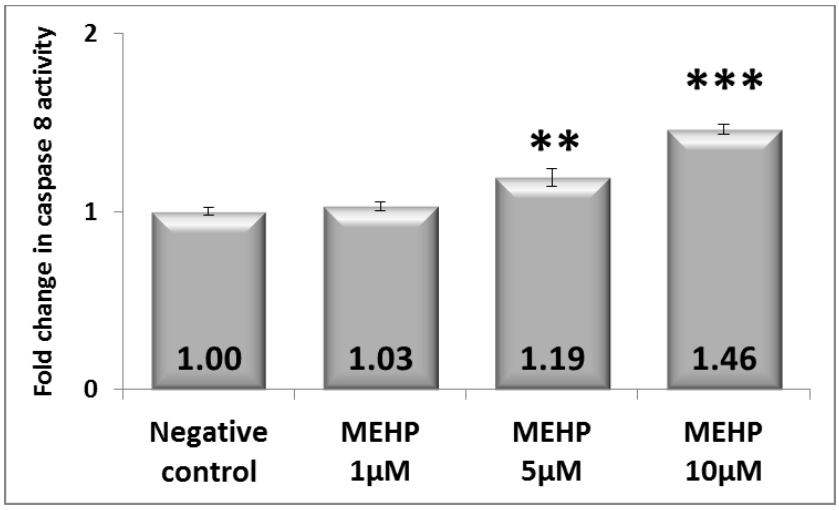


Figure 36. Activité de la caspase 8. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du MEHP. L'activité des caspases 8 est mesurée par microtitration fluorimétrique après lyse des cellules et ajout de substrats. ** p<0,005 ; *** p < 0.001 vs negative control.

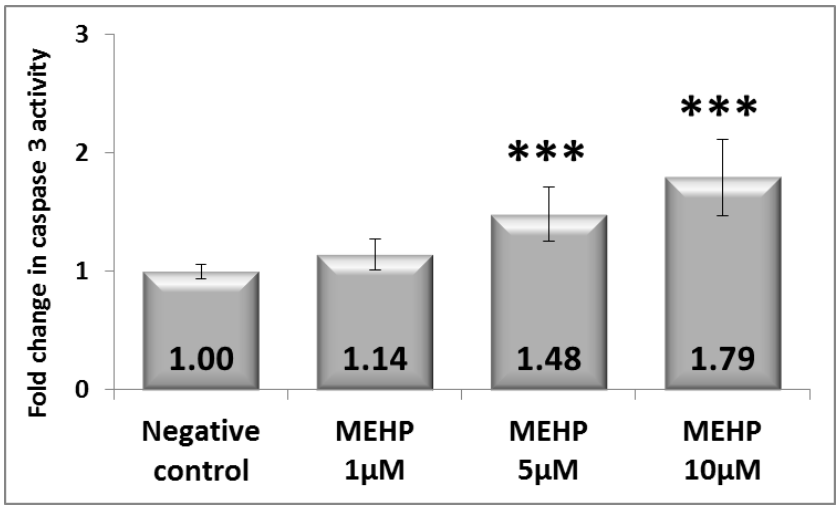


Figure 37. Activité de la caspase 3. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du MEHP. L'activité des caspases 3 est mesurée par microtitration fluorimétrique après lyse des cellules et ajout de substrats. *** $p < 0.001$ vs negative control.

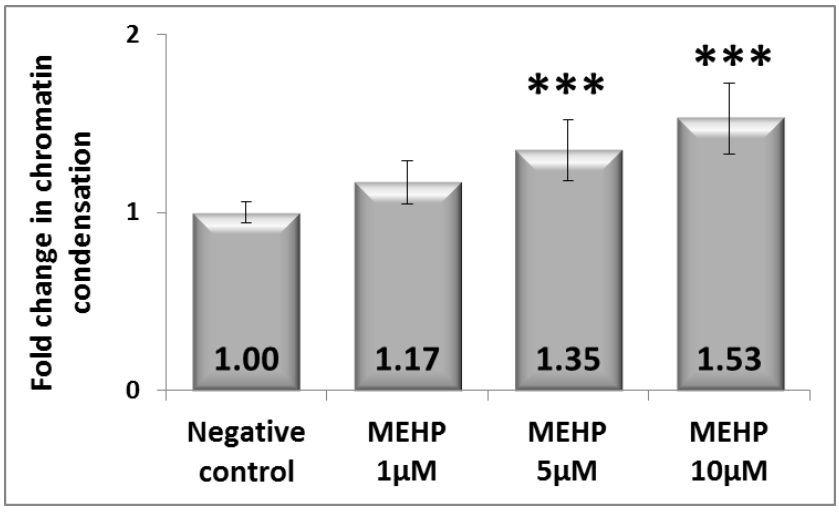


Figure 38. Condensation de la chromatine. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du MEHP. La condensation de la chromatine est mesurée par microtitration fluorimétrique après incubation des cellules avec la sonde Hoeschst 33342.
*** $p < 0.001$ vs negative control.

A 5 et 10µM, le MEHP induit l'activation concentration-dépendante de la caspase 8, impliquée dans la voie extrinsèque de l'apoptose, et la caspase 3, caspase effectrice de

l'apoptose, après 72 heures d'incubation. De plus, la condensation de la chromatine est également observée à 5µM et 10µM. Ainsi, le MEHP induit une apoptose caspase-dépendante aux concentrations subtoxiques.

La voie d'apoptose extrinsèque est médiée par l'activation de récepteurs membranaires. Parmi ceux-ci, le récepteur P2X7 est un récepteur impliqué dans les mécanismes de dégénérescence et peut induire la mort cellulaire lorsqu'il est activé. Nous avons dans un premier temps étudié son expression par les cellules JEG-3.

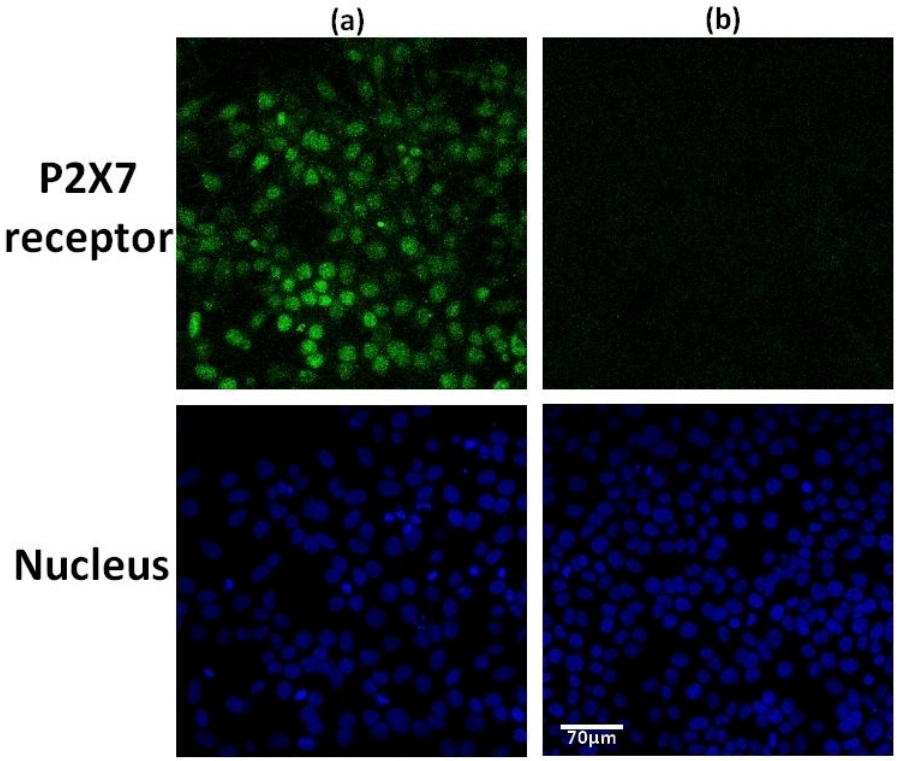


Figure 39. Expression du récepteur P2X7 en microscopie confocale. (a) cellules JEG-3 incubées avec l'anticorps primaire puis l'anticorps secondaire, (b) contrôle isotypique, cellules incubées avec un anticorps anti-IgG puis l'anticorps secondaire. L'ADN est marqué par la sonde TO-PRO-3.

Suite au marquage immunucytochimique du récepteur P2X7 et à l'observation en microscopie confocale, nous montrons que les cellules de la lignée trophoblastique JEG-3 expriment le récepteur P2X7. Dans un second temps, nous avons étudié son activation après incubation avec le MEHP.

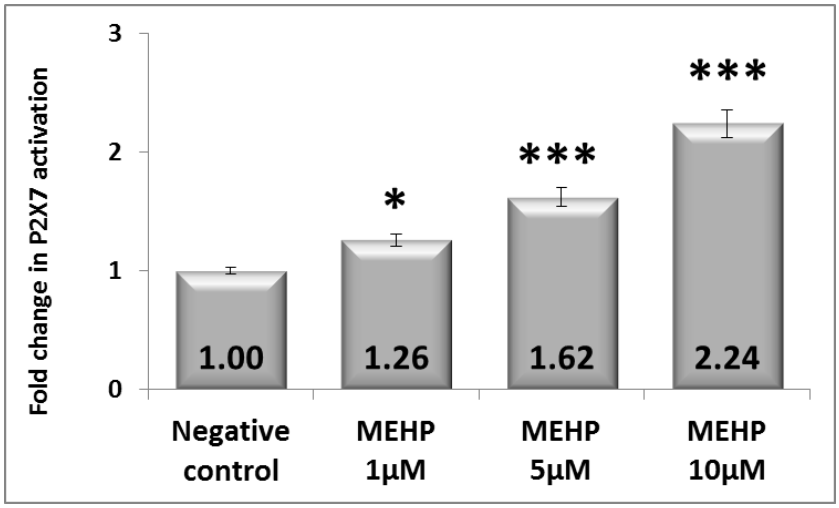


Figure 40. Activation du récepteur de dégénérescence P2X7. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du MEHP. Le test YO-PRO-1 en microtitration cytofluorimétrique est réalisé afin d'évaluer l'ouverture des pores de perméabilité du récepteur P2X7. * p <0,01 ; *** p < 0.001 vs negative control.

Le MEHP induit l'activation du récepteur de dégénérescence P2X7 de manière concentration dépendante dès 1µM.

- **Discussion**

Il a été suggéré que l'exposition au DEHP ou MEHP *in utero* pourrait être un facteur de risque d'accouchement prématuré (Y Zhang et al. 2009). Nous pensons qu'il est donc important d'étudier les mécanismes cellulaires sous-jacents à une telle exposition sur un modèle placentaire. Aux concentrations les plus élevées que nous avons testées, le DEHP exerce une cytotoxicité sur les cellules JEG-3. Il est connu que ses effets toxiques sont principalement médiés par ses métabolites. Nos résultats laissent donc supposer que la

cytotoxicité observée après incubation des cellules avec le DEHP est induite par ses métabolites ; le DEHP serait donc métabolisé par la lignée cellulaire JEG-3. Le MEHP étant le métabolite principal du DEHP, nous avons incubé les cellules avec du MEHP et avons observé qu'il exerce une cytotoxicité à partir de 25µM. Les concentrations de MEHP utilisées dans notre étude sont des concentrations proches de celles retrouvées dans le cordon ombilical. En effet, des concentrations de l'ordre du micromolaire et pouvant aller jusqu'à environ 40µM de MEHP ont été retrouvées dans le cordon ombilical (Y Huang et al. 2014; Lin et al. 2008; Y Zhang et al. 2009). Les concentrations de MEHP avec lesquelles nous avons travaillé pour étudier les effets cellulaires de ce micropolluant sont donc proches de la réalité physiologique.

Nous avons par la suite souhaité valider notre modèle cellulaire pour l'étude du MEHP. Le MEHP est connu pour être un ligand du récepteur nucléaire PPARγ (Hurst and Waxman 2003; Maloney and Waxman 1999) et il nous a paru pertinent d'étudier l'activation de ce récepteur sur notre modèle cellulaire. Nos résultats montrent une activation de PPARγ après incubation des cellules avec du MEHP durant 72 heures, ce qui suggère que la lignée de trophoblastes JEG-3 est une lignée adaptée à l'étude des effets toxiques induits par le MEHP.

Le MEHP est issu du métabolisme du DEHP, classé PE avéré par l'Union Européenne ; nous avons donc souhaité étudier son effet PE. Pour cela, nous avons mesuré la sécrétion de deux hormones placentaires, l'hPL et l'hCG hyperglycosylée, par les cellules trophoblastiques JEG-3. Il apparait que le MEHP augmente la sécrétion d'hPL mais ne modifie pas la sécrétion d'hCG hyperglycosylée. Nous avons observé des résultats similaires après incubation des cellules trophoblastiques avec un autre PE reconnu, le bisphénol A. Les PE testés sur notre modèle cellulaire tendent donc à augmenter la sécrétion d'hPl sans modifier celle d'hCG hyperglycosylée. L'hPL est une hormone impliquée entre autres dans la préparation à la lactation et dans le phénomène d'insulinorésistance de la mère ayant pour objectif d'augmenter l'apport en nutriments au fœtus (Newbern and Freemark 2011). Une modification de la sécrétion d'hPL par le placenta pourrait donc avoir de graves conséquences sur la nutrition du fœtus et ainsi sur son développement. Il apparait essentiel, au vu de nos résultats et de la littérature, de doser la sécrétion de cette hormone dans l'évaluation du risque de nouveaux plastifiants. Ces tests de dosages hormonaux viendraient

compléter les tests actuellement utilisés pour l'étude des PE qui ont généralement recours à des modèles acellulaires ou à des levures. Ces modèles mesurent l'activation des récepteurs androgéniques et oestrogéniques ou le potentiel de liaison à ces récepteurs mais ne prennent pas en compte les régulations intracellulaires qui peuvent avoir lieu pour réparer les perturbations endocriniennes ; ils risquent donc de conclure à des faux positifs. Dans nos tests réalisés sur cellules vivantes humaines, nous ciblons l'étape finale des perturbations endocriniennes induites *in vitro* par les PE, à savoir la sécrétion hormonale.

Notre objectif a ensuite été de déterminer si la sécrétion de ces deux hormones placentaires dépend de l'activation des récepteurs aux œstrogènes ou aux androgènes, car comme nous l'avons dit précédemment, la majorité des PE agit sur ces récepteurs. Nous avons donc incubé les cellules placentaires JEG-3 avec un œstrogène, le 17β-œstradiol, ou un androgène, la testostérone. Cette dernière n'induit aucune modification de la sécrétion des hormones placentaires étudiées. A l'inverse, le 17β-œstradiol conduit à une augmentation de la sécrétion de l'hPL mais aussi de l'hCG hyperglycosylée. En réalisant ce test, nous pensions pouvoir mettre en évidence un effet androgénique ou oestrogénique mimétique induit par les PE testés sur notre modèle. Or, nos PE d'intérêt conduisant à une augmentation de la sécrétion d'hPL mais pas d'hCG hyperglycosylée, leur profil hormonal ne ressemble ni à celui de la testostérone, qui ne modifie pas les sécrétions hormonales étudiées, ni à celui du 17β-œstradiol, qui augmente significativement les deux hormones dosées. Les mécanismes de perturbation endocrinienne induits par les PE testés sur notre modèle semblent donc être des mécanismes plus complexes que ceux auxquels nous nous attendions. De plus, il est à noter que la différence d'amplitude de signal de l'hPL sécrétée entre le 17β-œstradiol et les PE testés aux mêmes temps et concentrations est élevée. Ces données exprimeraient donc que la constante d'affinité de nos PE, nommés xénooestrogènes par certains auteurs (Buteau-Lozano et al. 2008; La Sala et al. 2010), sur le récepteur aux œstrogènes est inférieure à celle du 17β-œstradiol, ce qui confirme des résultats précédemment publiés (Yiu et al. 2014).

Alors que les altérations mitochondriales sont généralement une des conséquences de l'exposition au MEHP et/ou DEHP (Ban et al. 2014; Chen et al. 2012), aucune altération mitochondriale n'a été observée jusqu'à 10µM de MEHP sur notre modèle cellulaire de trophoblastes JEG-3. Pourtant sur des cellules de Leydig, des altérations mitochondriales ont

été mises en évidence dans des conditions expérimentales proches des nôtres (Erkekoglu et al. 2010). Ces résultats suggèrent donc que les cellules placentaires possèdent des mécanismes de réponse spécifiques au micropolluant MEHP qui ne passent pas par la mitochondrie.

Outre les altérations mitochondriales, le micropolluant MEHP est susceptible de causer d'autres dommages intracellulaires, notamment des mécanismes apoptotiques, comme il l'a été démontré sur d'autres modèles (Chen et al. 2012; Yokoyama et al. 2003). Sur notre modèle placentaire, le MEHP induit l'activation de la caspase 8 impliquée dans la voie d'apoptose extrinsèque, la caspase 3, caspase effectrice de l'apoptose, ainsi que la condensation de la chromatine, une étape irréversible de l'apoptose. L'activation de la caspase 8 associée à l'absence d'altération du potentiel transmembranaire mitochondrial suggère que le MEHP induit une apoptose caspase dépendante passant par la voie des récepteurs membranaires. Pour la première fois, nous avons mis en évidence l'expression du récepteur membranaire de dégénérescence P2X7 par la lignée JEG-3. En effet, jusqu'à présent ce récepteur était montré comme étant exprimé dans de nombreux tissus dont le placenta (Roberts et al. 2006) mais rien n'avait été publié sur la lignée de cellules JEG-3. Nos travaux ouvrent donc des perspectives d'études en ce qui concerne ce récepteur impliqué dans de nombreux phénomènes cellulaires. Dans notre modèle, le MEHP active les récepteurs P2X7 *via* la formation de pores de perméation membranaires. L'activation de ce récepteur sur le long terme pourrait induire une dégénérescence du tissu placentaire et ainsi entraîner des complications de la grossesse. L'activation de ce récepteur sur notre modèle est donc un biomarqueur de dégénérescence cellulaire du placenta et pourrait être inclus dans les tests d'évaluation du risque pour la grossesse.

3.2.2 Etude des effets du MEHP sur une lignée de monocytes humains différenciée en macrophages

- **Objectif**

Le placenta étant riche en cellules immunitaires telles que les macrophages et certaines pathologies cliniques étant associées à des phénomènes inflammatoires au niveau du placenta, nous nous proposons dans cette partie d'étudier les **effets du MEHP sur un modèle de macrophages humains**, notamment les altérations mitochondriales, mais également l'activation du récepteur de dégénérescence P2X7 et l'effet pro-inflammatoire du MEHP sur ces cellules.

- **Approche expérimentale**

Dans un premier temps, nous avons évalué la cytotoxicité du MEHP sur les monocytes U937 différenciés en macrophages.

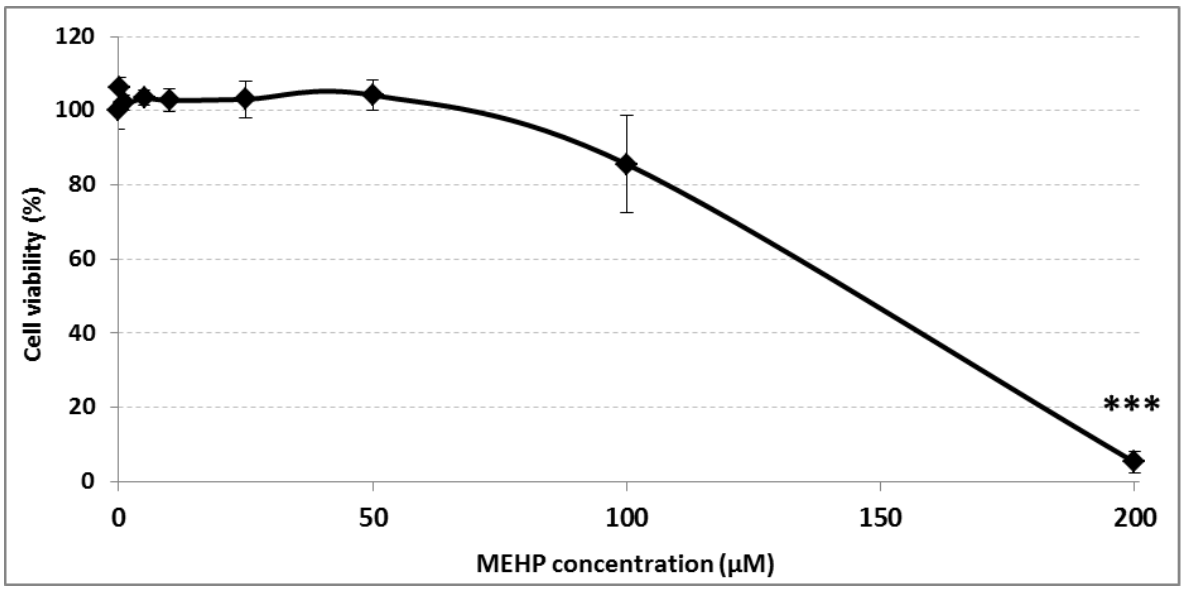


Figure 41. Viabilité cellulaire. Les macrophages sont incubés pendant 72 heures avec une gamme de concentrations de MEHP puis la viabilité cellulaire est évaluée par un test au rouge neutre en microtitration cytofluorimétrique. *** $p < 0.001$ vs 0µM de MEHP.

Le MEHP entraîne une très forte perte de viabilité des monocytes U937 différenciés en macrophages à partir de 200µM. Dans la suite de nos expérimentations, nous incuberons donc les cellules aux concentrations suivantes : 1µM, 10µM ; 50µM et 100µM.

Comme nous l'avons vu précédemment, les altérations mitochondriales sont généralement caractérisées entre autres par une modification du potentiel transmembranaire mitochondrial et un changement dans l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale.

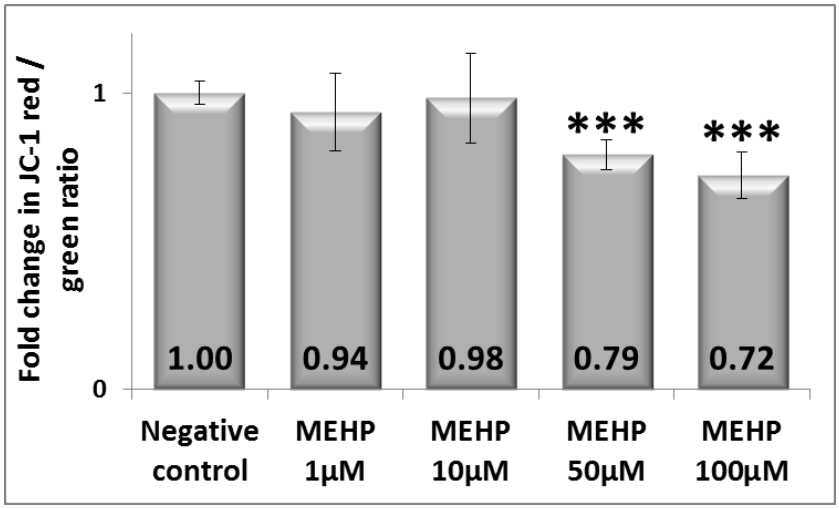


Figure 42. Potentiel transmembranaire mitochondrial. Les macrophages sont incubés pendant 72 heures avec du MEHP puis le potentiel transmembranaire mitochondrial est mesuré par la sonde JC-1 en microtitration cytofluorimétrique.

*** $p < 0.001$ vs negative control.

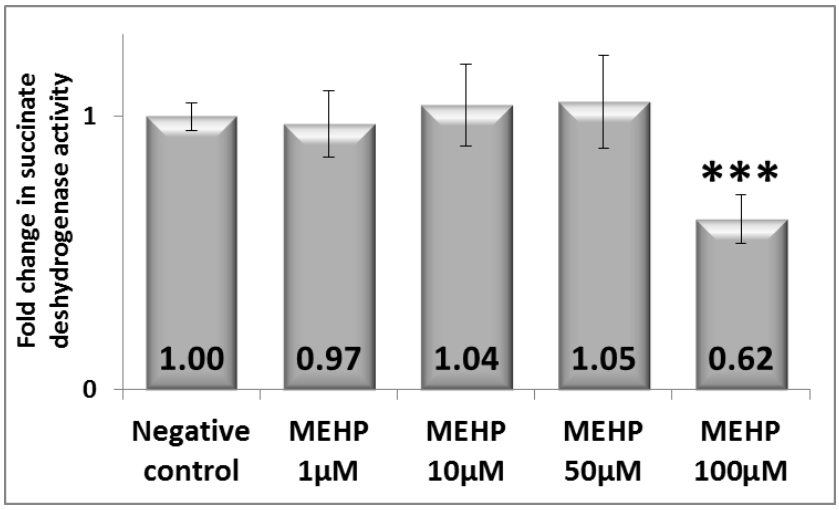


Figure 43. Activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Les macrophages sont incubés pendant 72 heures avec du MEHP puis l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale est mesurée par le test colorimétrique au MTT.

*** $p < 0.001$ vs negative control.

Le MEHP induit une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial à 50µM et 100µM. A 100µM, le MEHP entraîne également une diminution de l'activité de la succinate déshydrogénase.

Cette dernière appartenant à la chaîne respiratoire mitochondriale dont la fonction première est la production d'ATP, nous avons évalué la quantité d'ATP cellulaire total.

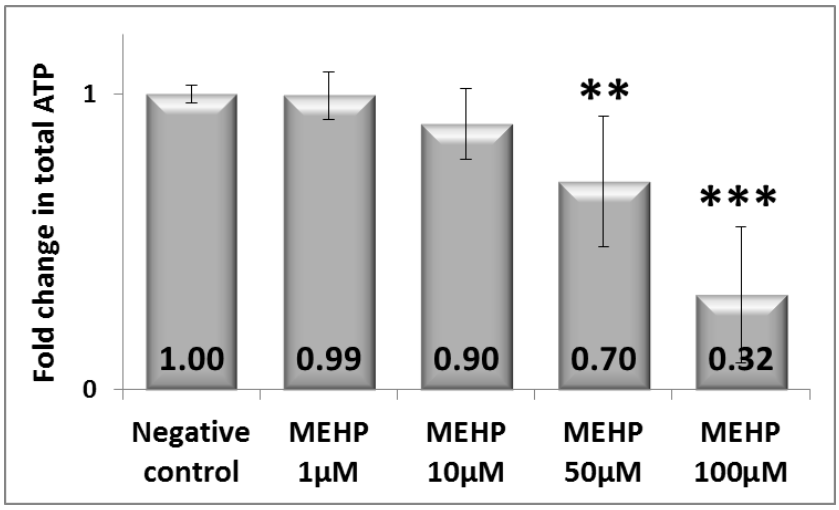


Figure 44. ATP total. Les macrophages sont incubés pendant 72 heures avec du MEHP puis lysées et l'ATP total est mesuré par ajout de substrats adéquats en bioluminescence. ** $p < 0,005$; *** $p < 0.001$ vs negative control.

Une diminution de la quantité d'ATP est observée après incubation des cellules avec le MEHP à partir de 50µM, cette diminution est drastique à 100µM. Le MEHP induit donc des perturbations mitochondriales qui aboutissent à une baisse dans la production d'ATP, source d'énergie principale des cellules. Une telle perte d'énergie pourrait à long terme avoir des conséquences graves sur la survie des cellules.

Outre son rôle de réserve d'énergie pour les cellules, l'ATP est le ligand naturel du récepteur P2X7. Nous nous sommes ensuite intéressée à l'activation de ce récepteur.

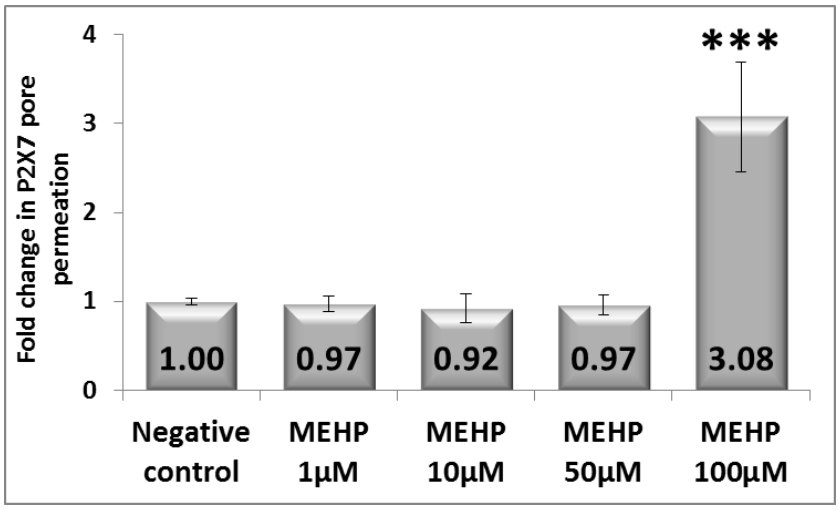


Figure 45. Activation du récepteur P2X7. Les macrophages sont incubés pendant 72 heures avec du MEHP. Le test YO-PRO-1 en microtitration cytofluorimétrique est réalisé afin d'évaluer l'ouverture des pores de perméabilité du récepteur P2X7. *** $p < 0.001$ vs negative control.

L'ouverture du pore de perméation P2X7 est stimulée après incubation des cellules avec le MEHP pendant 72 heures. Dans les cellules du système immunitaire, le récepteur P2X7 est impliqué dans la formation de l'inflammasome qui a pour conséquence la libération de la cytokine pro-inflammatoire IL-1β. Celle-ci conduit entre autres à la sécrétion d'une autre cytokine pro-inflammatoire, le TNF-α. Nous nous sommes donc proposée de doser ces deux cytokines pro-inflammatoires.

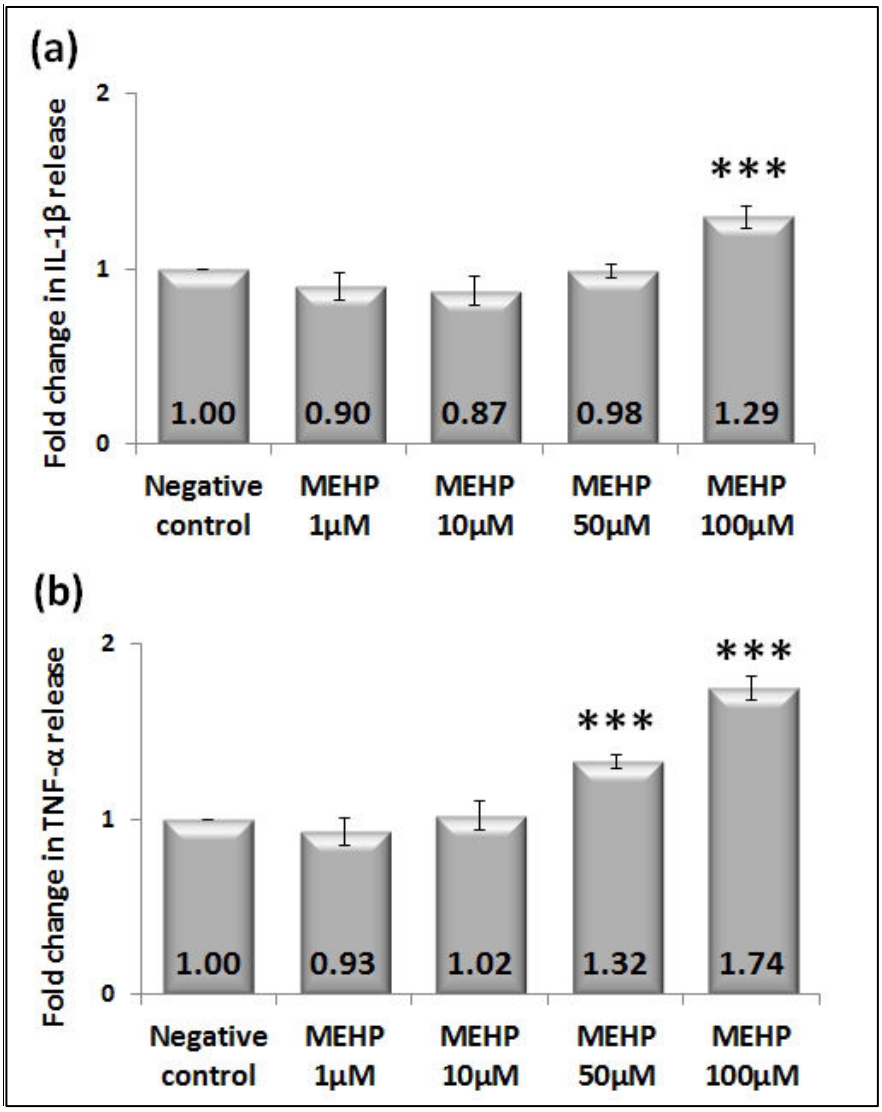


Figure 46. Relargage d'IL-1β et de TNF-α. Les macrophages sont incubés pendant 72 heures avec du MEHP. Le relargage d'IL-1β et de TNF-α est évalué dans les surnageants cellulaires par la technique ELISA. *** $p < 0.001$ vs negative control.

Le relargage d'IL-1β est augmenté après incubation des cellules avec le MEHP à la même concentration qui active le récepteur P2X7 (100µM). De plus, la sécrétion de TNF-α augmente dès 50µM de MEHP.

- **Discussion**

Le placenta est un tissu riche en macrophages (Ben Amara et al. 2013; Houser 2012; Mues et al. 1989). Ces macrophages sont détectés très tôt dans le placenta, dès 10 jours de grossesse (Chang et al. 1993). Ils ont entre autres un rôle dans la fonction de barrière contre les pathogènes et sécrètent des facteurs régulant la réaction immunitaire locale, tant anti-inflammatoire que pro-inflammatoire (Mues et al. 1989). Dans un premier temps, nous avons déterminé les concentrations subtoxiques de MEHP à utiliser pour la suite de notre étude. Le MEHP est cytotoxique à partir de 200µM après 72 heures d'incubation. Comme vu dans le chapitre précédent, il est connu que le MEHP induit des altérations mitochondriales sur d'autres modèles cellulaires. Dans un second temps, nous avons donc étudié ces modifications. Sur notre modèle, le MEHP entraîne une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ainsi qu'une diminution de l'activité de la succinate déshydrogénase aux plus fortes concentrations testées, associées à une baisse de la quantité d'ATP. D'après nos résultats, cette diminution s'explique par la baisse d'activité de la succinate déshydrogénase qui est une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale dont la fonction est de produire l'ATP. Le MEHP étant un micropolluant auquel l'organisme est exposé de façon chronique, ces perturbations mitochondriales énergétiques observées sur les macrophages peuvent à long terme entrainer des altérations importantes du système immunitaire. En outre, il apparaît que la faible quantité d'ATP produite par les macrophages après incubation avec le MEHP active les récepteurs P2X7 : pour la première fois, nous avons montré qu'il induit l'activation de ce récepteur conduisant ainsi à la formation de pores de perméation. D'un point de vue mécanistique, l'activation du récepteur P2X7 est associée dans la littérature à la formation de l'inflammasome, un complexe protéique oligomérique impliqué dans la réponse inflammatoire et conduisant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1β (Dubyak 2012; Mortaz et al. 2012) et le TNF-α (Alves et al. 2013). Nous avons donc dosé le niveau de sécrétion de ces deux cytokines pro-inflammatoires par les monocytes humains transformés en macrophages après 72 heures d'exposition au MEHP et avons détecté que leur niveau augmentait significativement. La variation de sécrétion d'IL-1β apparaît à la même concentration que celle qui active le récepteur P2X7, ce qui suggère que ces évènements sont étroitement corrélés. La sécrétion de TNF-α apparaît dès 50µM de MEHP, concentration qui n'active pas le récepteur P2X7. Ceci s'explique par les nombreuses voies de signalisation cellulaire P2X7-indépendantes conduisant à la sécrétion

de TNF-α. Notre étude portant sur un modèle humain est en cohérence avec les résultats obtenus par d'autres équipes sur des lignées de macrophages murin et de rat (Bolling et al. 2012; Rakkestad et al. 2010). En cas d'exposition *in utero* aux phtalates, les niveaux des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNF-α sont augmentés dans le sang des femmes enceintes (Ferguson et al. 2014a). D'après nos résultats, nous pouvons envisager qu'il existerait une amplification des mécanismes pro-inflammatoires au niveau du placenta *via* la présence de cytokines circulantes dans le sang maternel d'une part, et *via* la sécrétion de ces mêmes cytokines localement par les macrophages résidents du placenta d'autre part. Il est établi depuis plusieurs décennies que l'administration systémique de ces deux cytokines pro-inflammatoires à des animaux gestants entraîne la parturition avant terme (Romero et al. 1991; Sadowsky et al. 2006; Silver et al. 1993). Chez la femme enceinte, il a été montré que les niveaux de ces deux cytokines pro-inflammatoires étaient augmentés dans le liquide amniotique en cas d'inflammation du chorion ou de travail prématuré (Arntzen et al. 1998), ainsi que dans d'autres pathologies associées à la grossesse telles que des infections fœtales (Garcia et al. 1989; Popek 1992) ou le risque de prééclampsie (Labarrere and Althabe 1985; Salafia et al. 1995), et que l'inflammation chronique des villosités placentaires est associée à des fausses couches à répétition (Doss et al. 1995; Kohut et al. 1997). Conséquemment, outre ses effets PE, le MEHP pourrait avoir de graves conséquences sur le déroulement de la grossesse, notamment en entraînant une réaction inflammatoire chronique au niveau du placenta.

Recherche sur le micropolluant BaP

3.3. ETUDE DES EFFETS DU BaP SUR LA LIGNEE CELLULAIRE JEG-3

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication soumise dans la revue Environmental Health Perspectives en 2014 sous le titre « **Use of placenta as a target organ to study chemicals toxicity: role of P2X7 receptor and lipid raft modification in benzo[a]pyrene toxicity »** (Cf. annexe A).

- **Objectif**

L'objectif de cette partie est d'étudier les **effets cellulaires induits par le BaP sur notre modèle de trophoblastes**. Nous étudierons dans un premier temps la cytotoxicité du BaP sur les cellules JEG-3 puis sa métabolisation. Nous analyserons ensuite les perturbations mitochondriales induites par le BaP ainsi que certaines réponses cellulaires déclenchées par le stress oxydant et les dommages à l'ADN. Nous étudierons ensuite la sécrétion des hormones placentaires sur ce modèle puis les perturbations des microenvironnements matriciel et lipidique induites par le BaP, incluant l'expression du récepteur CD44 et de la cavéoline-1 mais aussi l'activation du récepteur de dégénérescence P2X7.

- **Approche expérimentale**

➢ **<u>Cytotoxicité</u>**

Le BaP étant un agent toxique pour la majorité des cellules de l'organisme, nous avons quantifié la viabilité cellulaire de la lignée JEG-3 après 72 heures d'incubation. Cette molécule est un micropolluant, nous avons donc sélectionné une gamme de concentrations de l'ordre du micromolaire.

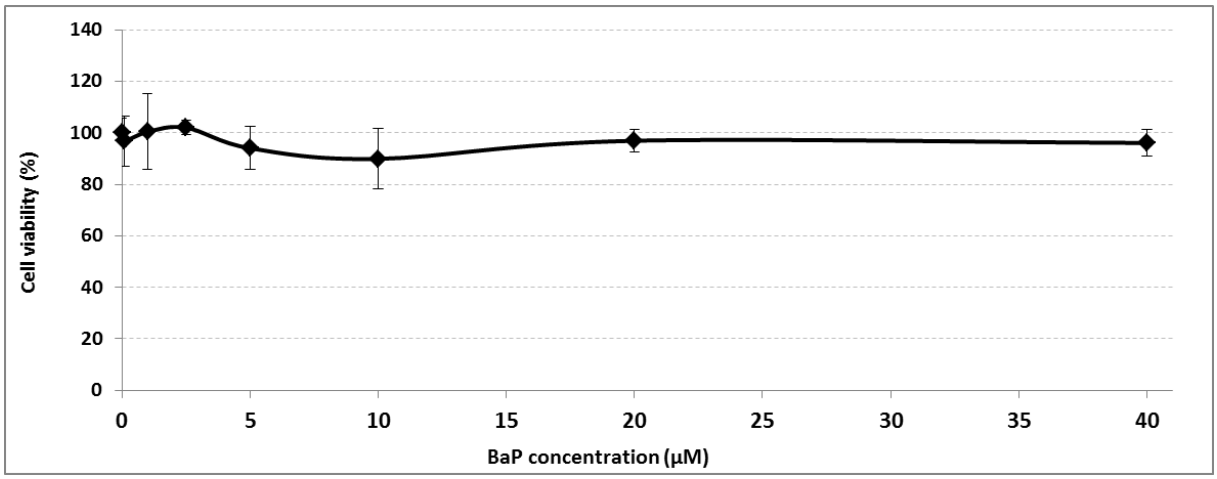


Figure 47. Viabilité cellulaire. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis la viabilité cellulaire est évaluée par un test au rouge neutre en microtitration cytofluorimétrique.

Le BaP n'induit aucune perte de viabilité jusqu'à 40µM après 72 heures d'incubation. La majorité des études *in vitro* étant réalisées à des concentrations allant jusqu'à 10µM, nous choisissons cette concentration comme concentration maximale pour la suite des expérimentations.

Aucune perte de viabilité n'étant observée aux concentrations testées, nous avons voulu nous assurer que le BaP est bien métabolisé par la lignée de trophoblastes JEG-3.

- **Métabolisation du BaP**

Le BaP est métabolisé par les cytochromes P450 1A1 et 1B1 (respectivement CYP1A1 et CYP1B1) ; nous avons donc évalué l'activité de CYP1A1 et 1B1 par réaction enzymatique fluorescente et recherché certains métabolites du BaP en spectrométrie de masse après 72 heures d'incubation.

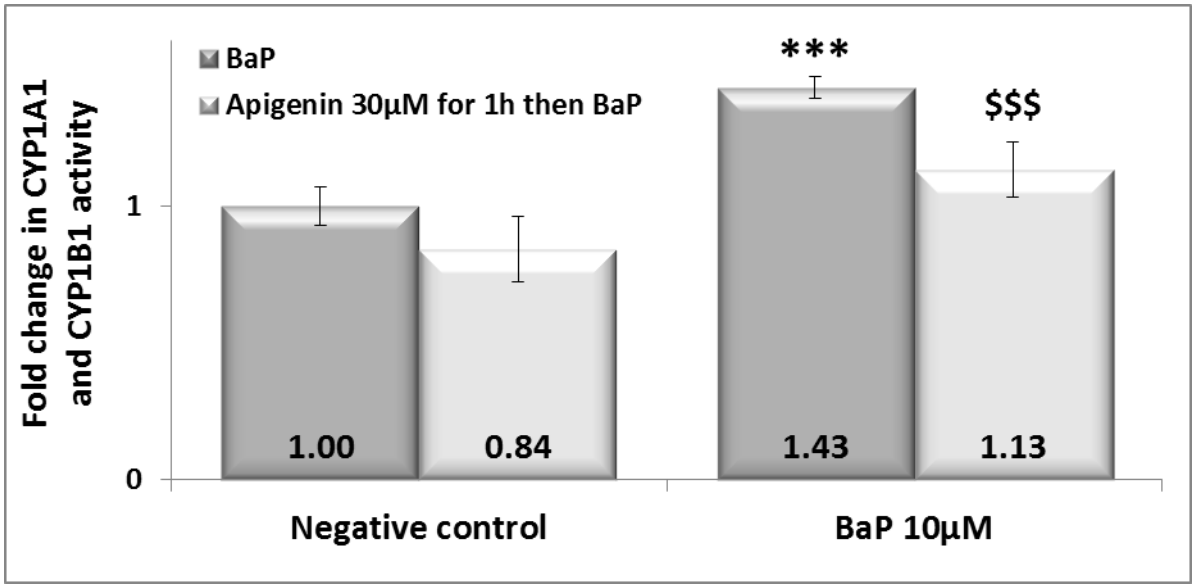


Figure 48. Activité des CYP1A1 et 1B1. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec BaP (10µM). L'activité des CYP1A1 et 1B1 est évaluée par la sonde 7-EROD en microtitration cytofluorimétrique. *** $p < 0.001$ vs negative control ; $ $p < 0,01$; $$$ $p < 0.001$ vs BaP à la même concentration sans apigénine.

Le BaP induit une augmentation de l'activité des CYP1A1 et 1B1 à 10µM après 72 heures d'incubation. De plus, la préincubation des cellules avec l'apigénine, un inhibiteur spécifique des cytochromes P450 1, permet un retour au niveau basal de l'activité de ce cytochrome à 10µM, ce qui confirme que le BaP est métabolisé par les CYP1A1 et 1B1 présents dans les trophoblastes JEG-3.

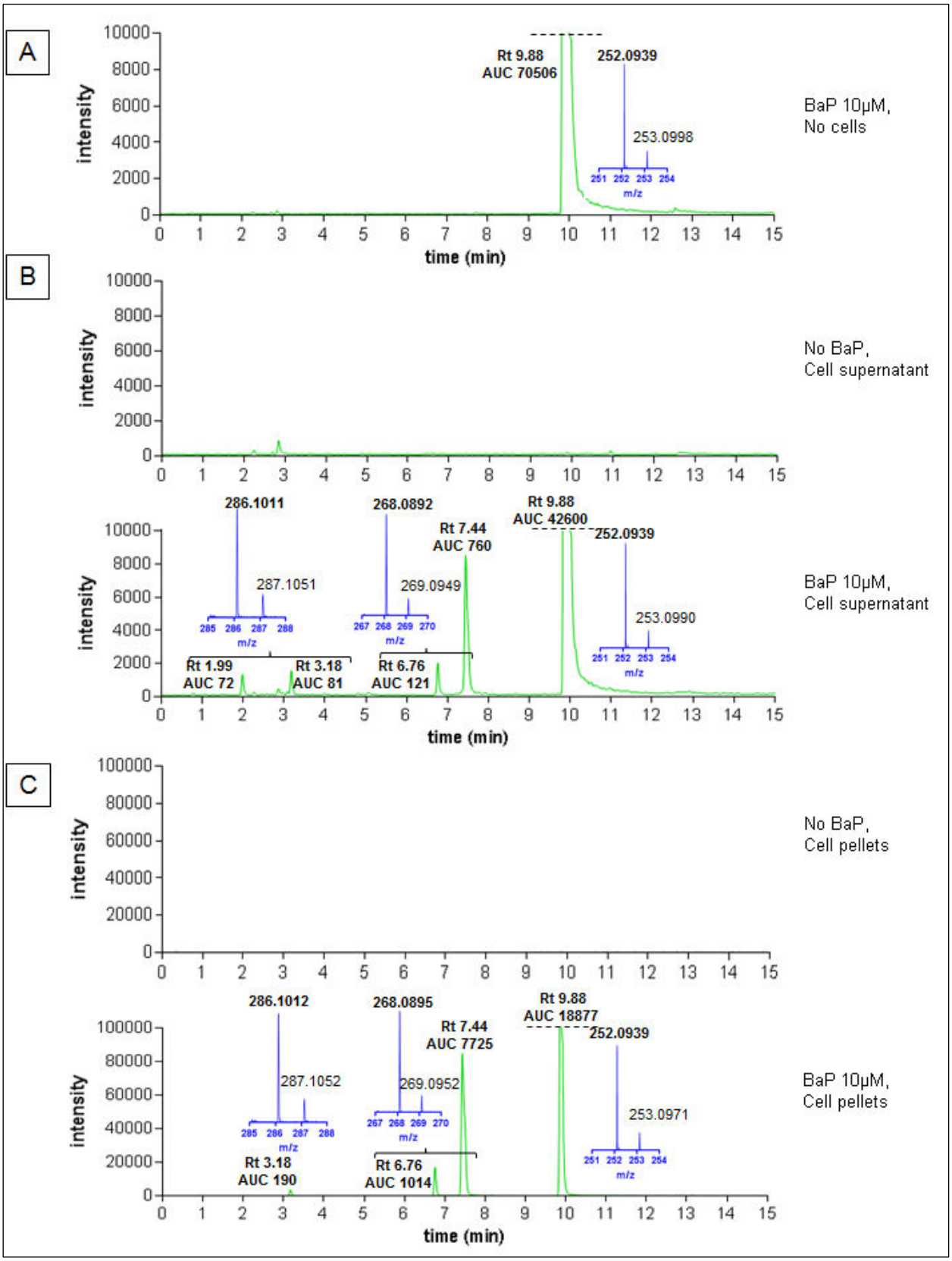


Figure 49. Détection du BaP et de ses métabolites. Chromatogrammes reconstitués (en vert) à m/z 252,0939 et 253,0990 (valeurs correspondant respectivement à l'ion $M^{+\bullet}$ BaP et ces métabolites) après incubation du BaP 10µM pendant 72 heures à 37°C en absence de cellule (A), en présence de cellules JEG-3 dans les surnageants de culture (B) et dans les cellules (C). Les inserts (en bleu) correspondent au spectre de masse du BaP et de ses métabolites. Les

aires sous la courbe (AUC) sont représentatives de la concentration en molécules dans l'échantillon.

Chemical name	m/z [b]	Rt [c] min	Cell-free culture medium		Cell culture supernatant		Cell pellet	
			m/z [d] (Δppm)	AUC [e]	m/z [d] (Δppm)	AUC [e]	m/z [d] (Δppm)	AUC [e]
BaP	252,0939	9,88	252,0939 (0)	70506	252,0939 (0)	42600	252,0939 (0)	18877
BaP oxide [a] or hydroxy BaP [a]	268,0888	6,76	ND	0	268,0899 (4)	121	268,0899 (4)	1014
BaP oxide [a] or hydroxy BaP [a]	268,0888	7,44	ND	0	268,0892 (2)	760	268,0895 (3)	7725
BaP dihydrodiol [a]	286,0994	1,99	ND	0	286,1011 (6)	72	ND	0
BaP dihydrodiol [a]	286,0994	3,18	ND	0	286,1005 (4)	81	286,1034 (6)	190

Tableau 3. BaP et ses métabolites oxydés après 72 heures d'incubation des cellules JEG-3 avec 10µM de BaP. (a) isomère indéterminé, (b) valeur calculée de $M^{+\bullet}$, (c) temps de rétention (minutes), (d) valeur expérimentale de $M^{+\bullet}$, (e) aire sous la courbe (unités arbitraires).

Nous avons tout d'abord voulu vérifier que le BaP n'était pas dégradé chimiquement pendant les 72 heures d'incubation à 37°C et l'avons donc analysé en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à haute résolution. Le BaP est bien détecté dans le milieu de culture et aucun de ses métabolite n'apparait (Figure 49, A et tableau 3) ; le BaP ne subit donc pas de dégradation chimique en absence de cellule.

Nous avons ensuite recherché la présence de BaP et ses métabolites dans les surnageants de culture et dans les culots cellulaires. Ni le BaP, ni ses métabolites ne sont détectés dans le témoin négatif (Figure 49, B et C haut) ; il n'y a donc pas de source exogène de BaP sur notre modèle. Dans les surnageants et les culots cellulaires des cellules incubées avec le BaP, ce micropolluant est détecté en quantité inférieure à celle retrouvée en absence

de cellule (Figure 49, B et C bas et tableau 3). De plus, certains de ses métabolites oxydés sont détectés. Ainsi, les résultats que nous avons obtenus par spectrométrie de masse corroborent nos résultats précédents : le BaP est bien métabolisé par la lignée de trophoblastes JEG-3.

- **Apoptose**

Le BaP n'induit pas de perte de viabilité sur notre modèle cellulaire, contrairement aux effets cytotoxiques qu'il exerce sur d'autres types cellulaires. Sur ces autres modèles, le BaP induisant également de l'apoptose, nous nous sommes intéressée à une étape précoce et irréversible de l'apoptose, la condensation de la chromatine, ainsi qu'à la fragmentation de l'ADN conduisant à l'apparition du pic SubG1 en cytométrie en flux.

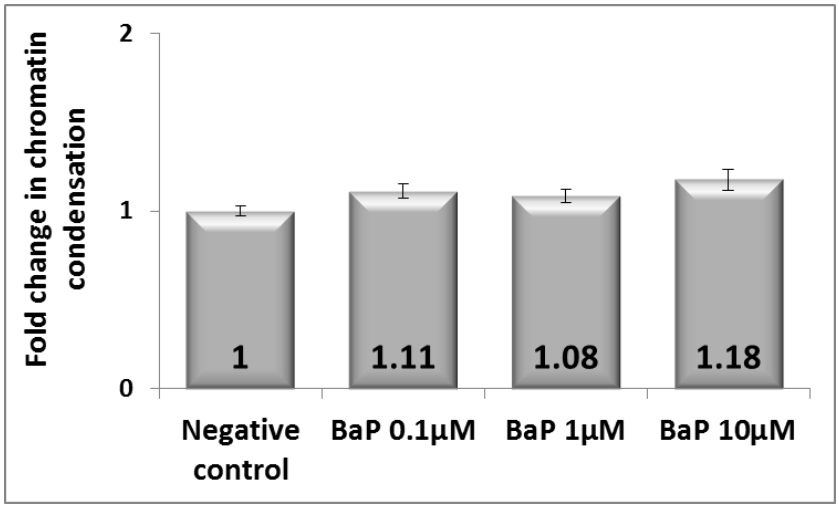


Figure 50. Condensation de la chromatine. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis la condensation de la chromatine est évaluée par le test Enzo Nuclear ID en microtitration cytofluorimétrique.

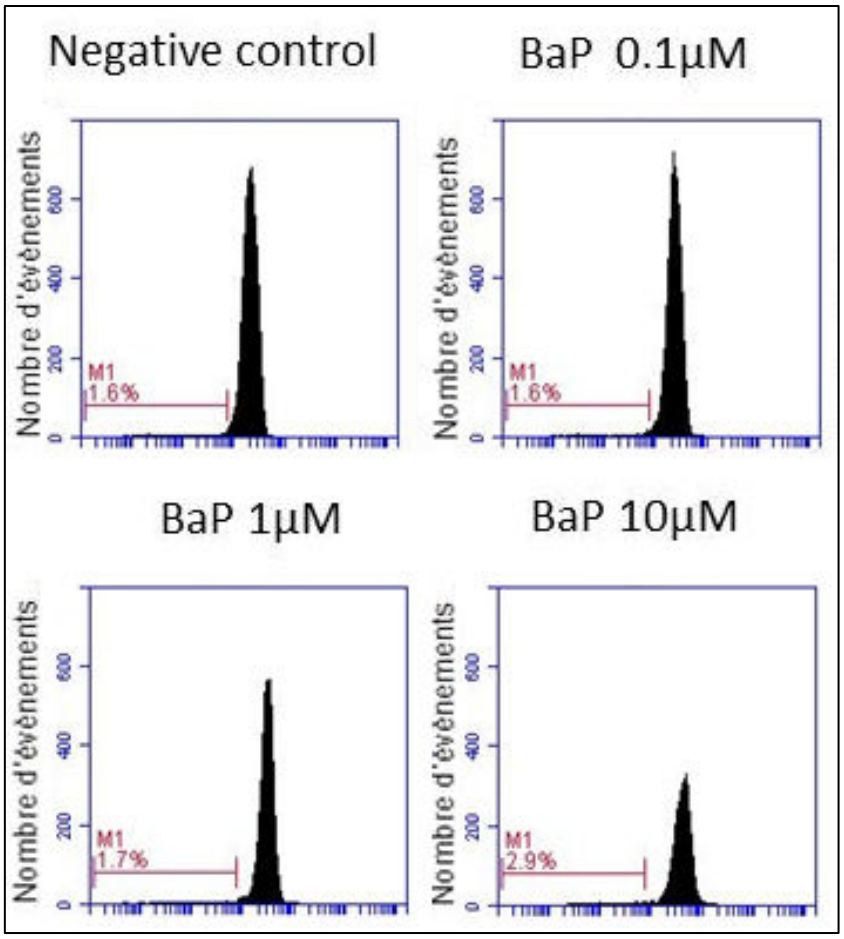


Figure 51. Analyse du pic SubG1. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis l'ADN des cellules est marqué à l'iodure de propidium et les cellules sont analysées en cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules en SubG1 est déterminé par le pourcentage de cellules détectées sous le trait rouge. Ces résultats sont représentatifs de 3 expérimentations.

Jusqu'à 10µM, le BaP n'induit pas d'apoptose sur la lignée de cellules JEG-3. Ainsi, il ne semble avoir aucun effet cytotoxique.

Bien que métabolisé par les cellules JEG-3, le BaP n'induit ni perte de viabilité cellulaire, ni apoptose dans nos conditions expérimentales. Ceci pourrait suggérer que les cellules JEG-3 répondent différemment des autres types cellulaires (foie, poumon, rein…) au BaP. La littérature décrivant communément les altérations mitochondriales induites par le BaP, nous nous sommes par la suite intéressée à celles-ci.

- **Altérations mitochondriales**

Les altérations mitochondriales sont généralement caractérisées entre autres par une modification du potentiel transmembranaire et de la masse mitochondriaux ainsi que d'un changement dans l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale.

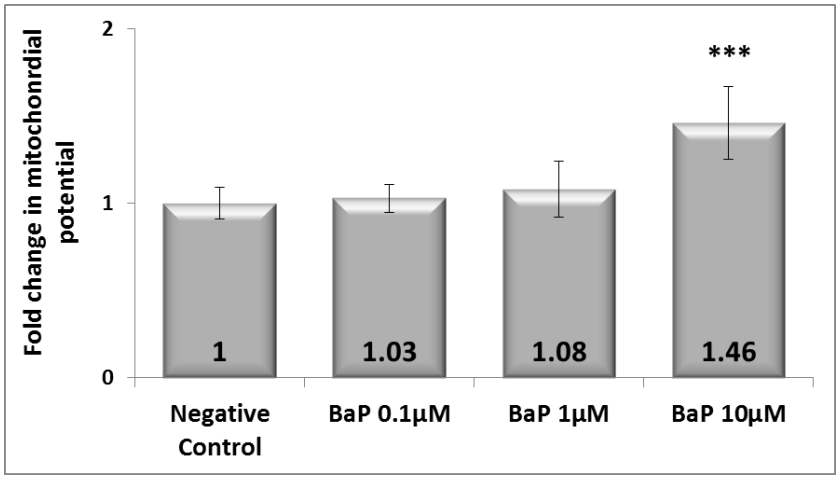


Figure 52. Potentiel transmembranaire mitochondrial. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis le potentiel transmembranaire mitochondrial est mesuré par la sonde rhodamine 123 en microtitration cytofluorimétrique.

*** $p < 0.001$ vs negative control.

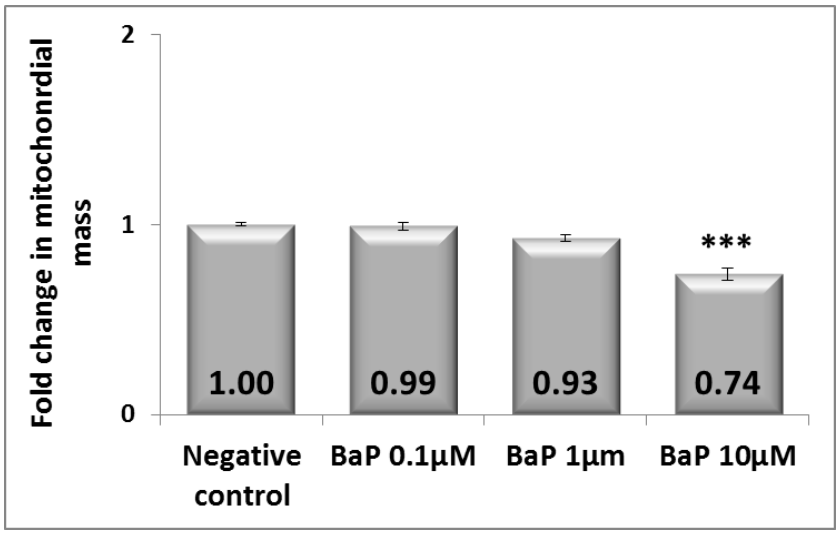


Figure 53. Masse mitochondriale. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis la masse mitochondriale est mesurée par la sonde NAO en microtitration cytofluorimétrique. *** $p < 0.001$ vs negative control.

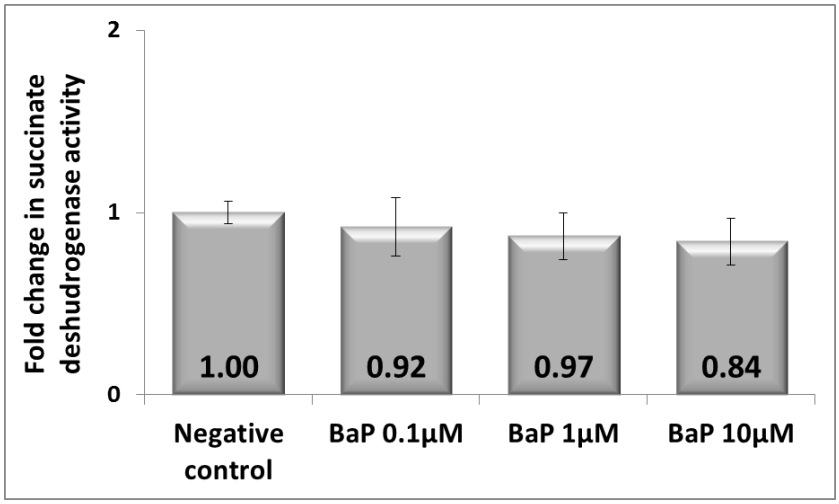


Figure 54. Activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale est mesurée par le test colorimétrique au MTT.

Le BaP induit une augmentation du potentiel transmembranaire mitochondrial à 10µM, ainsi qu'une diminution de la masse mitochondriale mais aucun changement dans l'activité de la succinate déshydrogénase. Aux concentrations de 0,1µM et 1µM, aucune altération mitochondriale n'est observée.

Le BaP étant transformé en métabolites oxydés, l'étude de certaines réponses au stress oxydant induit par le BaP a été réalisée. Nous avons étudié une des conséquences du stress oxydant au niveau de la membrane plasmique, la peroxydation lipidique. De plus, nous avons également évalué le niveau de glutathion oxydé, molécule intervenant dans les phénomènes de détoxification de la cellule, ainsi que l'activité du facteur de transcription NRF2, molécule centrale de la régulation antioxydante.

- **<u>Stress oxydant</u>**

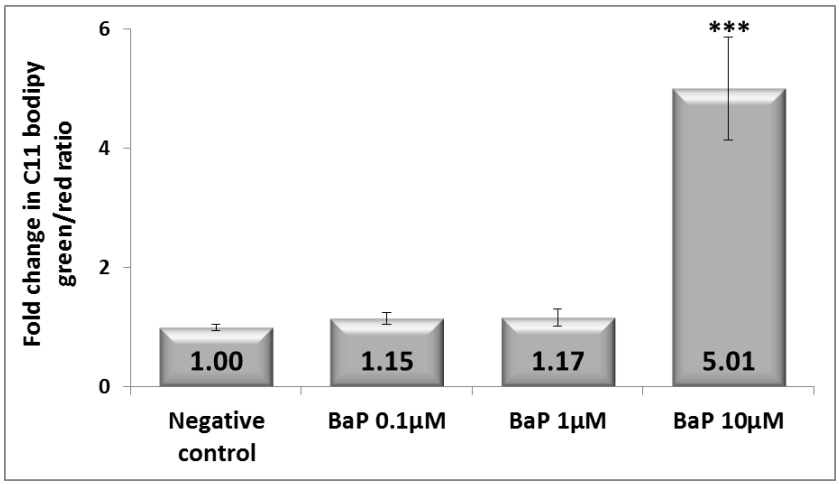


Figure 55. Peroxydation lipidique. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis la péroxydation lipidique est évaluée par la sonde C11-bodipy en microtitration cytofluorimétrique. *** $p < 0.001$ vs negative control.

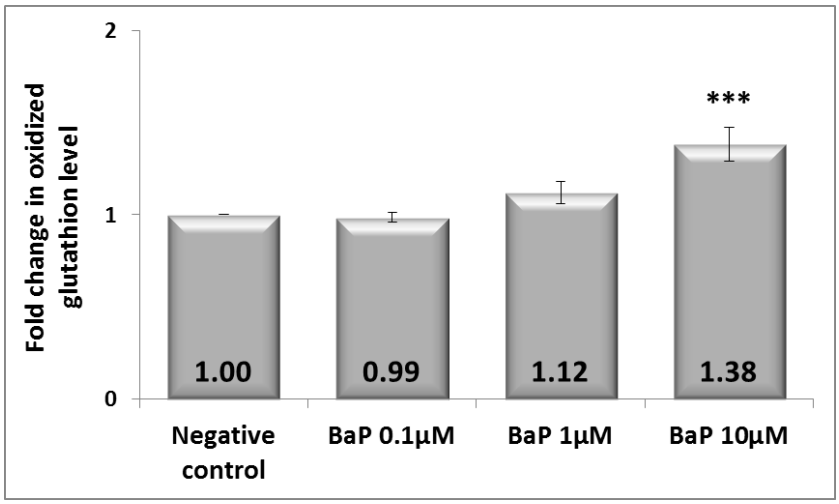


Figure 56. Niveau de glutathion oxydé par rapport au glutathion total. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis le niveau de glutathion oxydé rapporté au glutathion total est évalué par bioluminescence après lyse des cellules et ajout des substrats adéquats. * p < 0,01 ; *** p < 0.001 vs negative control.

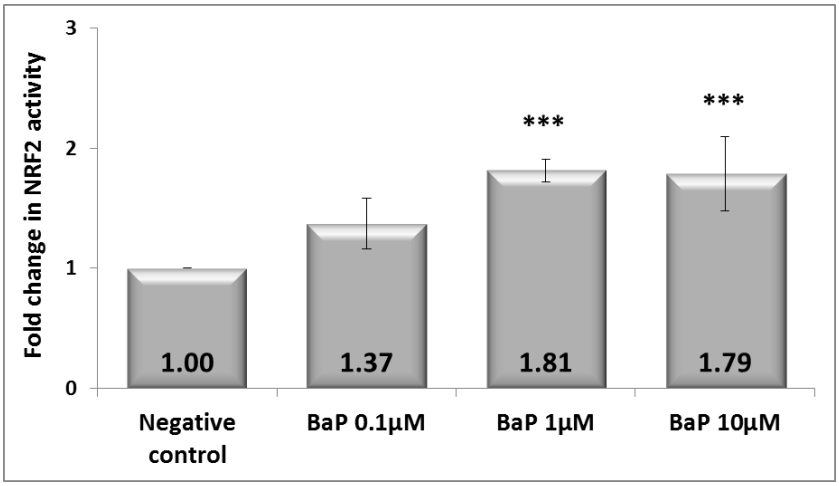


Figure 57. Activité du facteur de transcription NRF2. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 24 heures avec du BaP puis l'activité du facteur de transcription NRF2 est évaluée par technique ELISA sur extraits nucléaires préalablement isolés.

*** p < 0.001 vs negative control.

Le BaP induit une forte augmentation de la peroxydation lipidique et une augmentation du glutathion oxydé à 10µM. Une augmentation de l'activité du facteur de transcription NRF2 est observée à 1 et 10 µM après 24 heures d'incubation. Nos résultats obtenus sur cellules placentaires sont corrélés aux résultats décrits dans la littérature en ce qui concerne la réponse mitochondriale et le stress oxydant. Les cellules JEG-3 déclenchent des mécanismes de défense antioxydante par le biais de NRF2 à 1 et 10µM de BaP dès 24 heures ; à 1µM, les mécanismes de protection cellulaire apparaissent suffisants pour réguler le stress oxydant induit par le BaP qui n'apparaît à 72 heures, tandis qu'à 10µM, ils semblent déficients puisque nous observons des altérations mitochondriales, de la peroxydation lipidique et une augmentation du niveau de glutathion oxydé après 72 heures.

Le BaP étant une molécule carcinogène connue, nous nous sommes ensuite intéressée aux dommages à l'ADN qu'il peut induire.

- **<u>Dommages à l'ADN</u>**

Parmi les dommages à l'ADN pouvant être détectés, notre intérêt s'est porté sur les cassures simple et double brins.

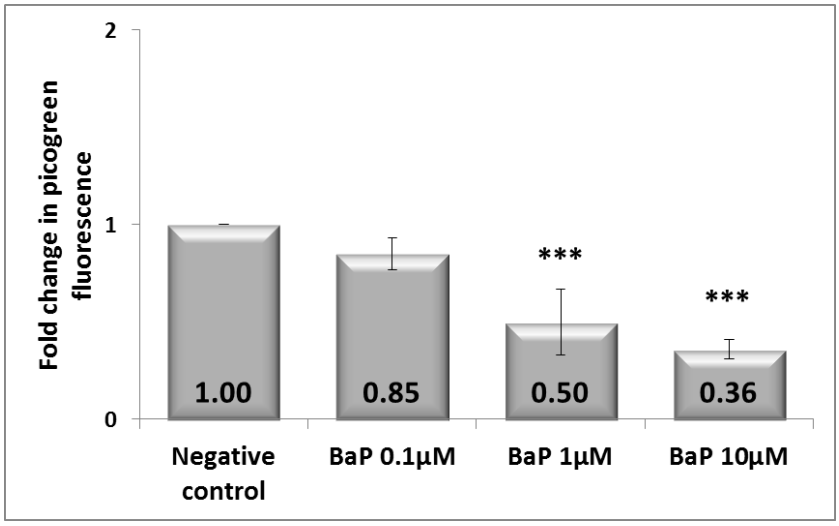


Figure 58. Evaluation de la quantité d'ADN double brin. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis la quantité relative d'ADN double brin est évaluée par la sonde Picogreen en fluorescence. *** $p < 0.001$ vs negative control.

Une diminution significative de la quantité d'ADN double brin est observée après incubation avec le BaP pendant 72 heures, ce qui est la traduction de cassures simple brin de l'ADN.

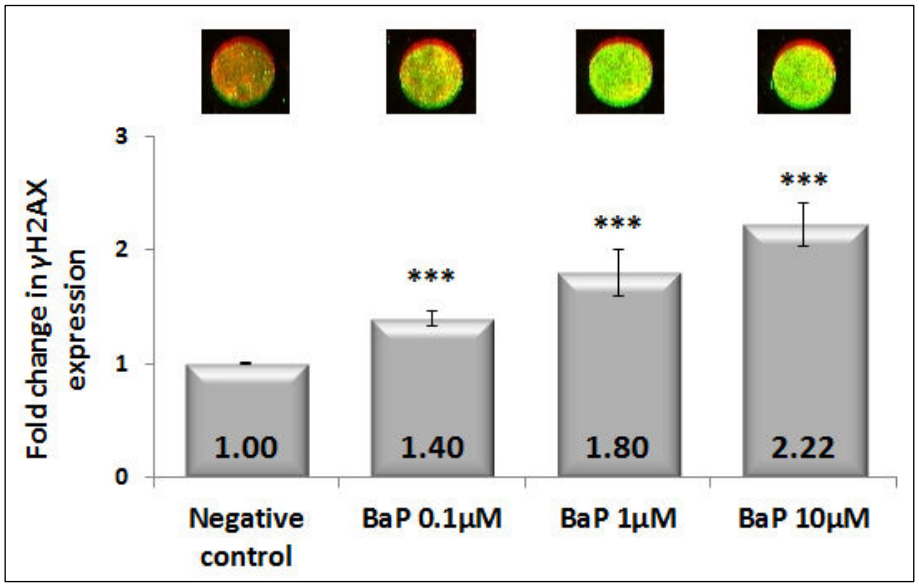


Figure 59. Expression de l'histone γH2AX. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis l'expression de l'histone γH2AX est évaluée par In Cell Western (photos représentant le merge entre le marquage de l'ADN en rouge et le marquage de l'histone γH2AX en vert). L'histogramme correspond à la quantification par le logiciel Image J de la fluorescence observée. *** $p < 0.001$ vs negative control.

L'histone H2AX est phosphorylée en cas de cassures double brin afin d'initier les mécanismes de réparation de l'ADN. Nous montrons ici une augmentation de l'expression de la forme phosphorylée de cette histone, ainsi devenue γH2AX, ce qui signifie que le BaP induit des cassures double brin de l'ADN sur notre modèle après 72 heures d'incubation.

➢ **Sécrétion hormonale**

Le BaP étant placé sur les listes de molécules à suivre en ce qui concerne les PE, la sécrétion de deux hormones placentaires a été étudiée.

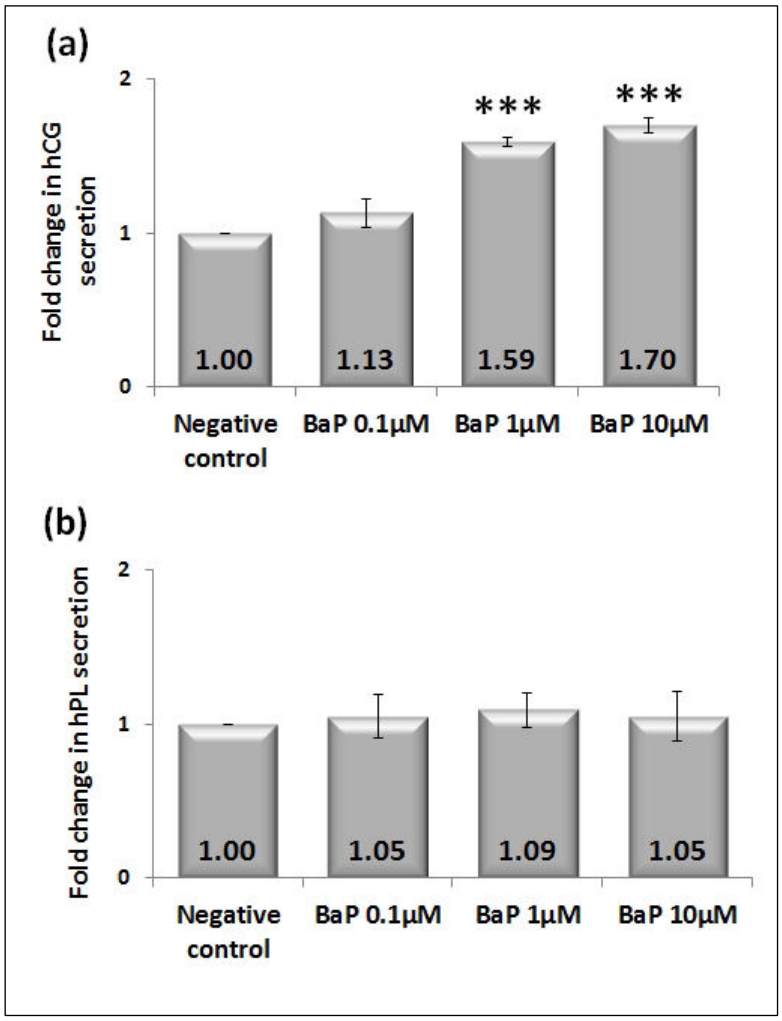


Figure 60. Sécrétion hormonale induite par le BaP. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP. La sécrétion d'hCG hyperglycosylée (a) et d'hPL (b) est mesurée dans les surnageants cellulaires par la technique ELISA. *** $p < 0.001$ vs negative control.

Le BaP conduit à une augmentation de la sécrétion d'hCG hyperglycosylée à 1µM et 10µM tandis qu'il ne modifie pas la sécrétion d'hPL, quelle que soit la concentration concernée. L'activation du récepteur PPARγ pouvant être liée à un phénomène de

perturbation endocrinienne comme c'est le cas avec le MEHP, nous avons évalué l'activation de ce récepteur.

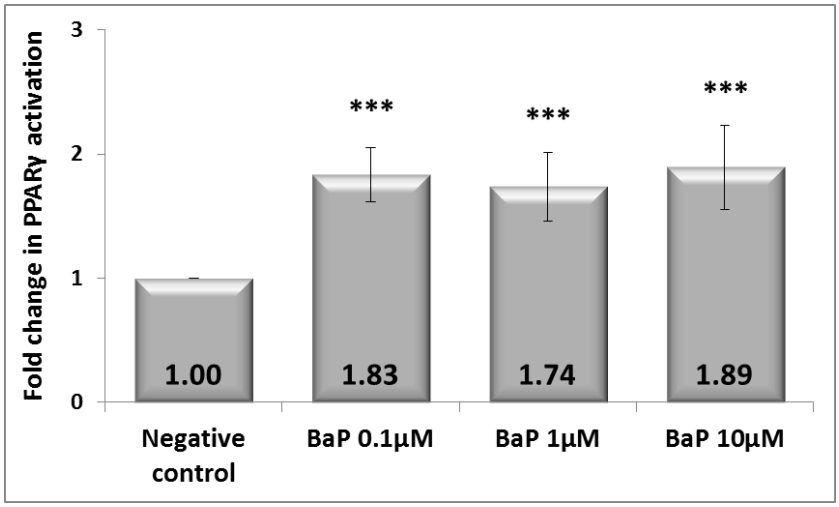


Figure 61. Activité du récepteur PPARγ. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 24 heures avec du BaP puis l'activité du récepteur PPARγ est évaluée par technique ELISA sur extraits nucléaires préalablement isolés. *** $p < 0.001$ vs negative control.

Dès 0,1µM, le BaP entraîne l'activation du récepteur nucléaire PPARγ. Cette activation du récepteur PPARγ n'est pas concentration dépendante et a lieu dans le même ordre d'amplitude quelle que soit la concentration en BaP.

Le BaP entre dans la cellule après avoir traversé le milieu extracellulaire puis franchit la membrane plasmique. Pour la suite de nos expérimentations, nous avons voulu savoir si le BaP pouvait modifier les microenvironnements lipidiques et membranaires des cellules JEG-3. Pour cela, nous avons dans un premier temps étudié le niveau d'un inhibiteur de métalloprotéases, TIMP-1, ainsi que celle du récepteur CD44, récepteur à l'acide hyaluronique constituant majeur de la matrice extracellulaire.

- **<u>Modifications du microenvironnement matriciel</u>**

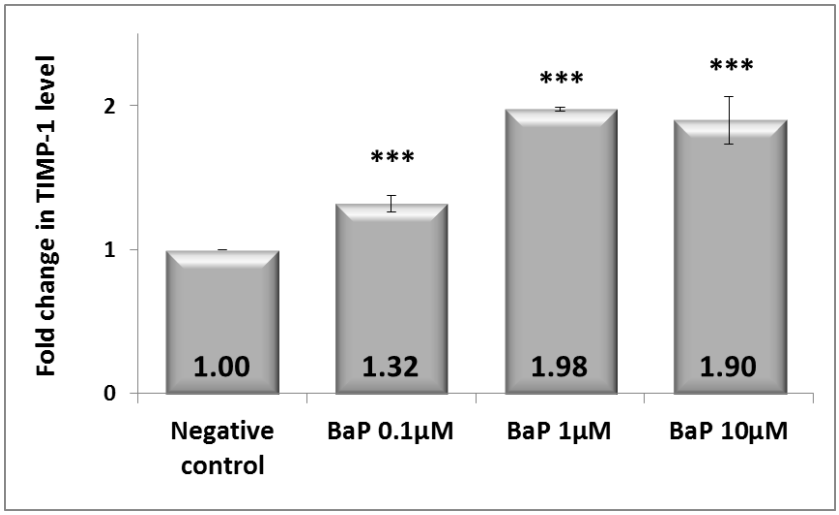


Figure 62. Dosage de l'inhibiteur de métalloprotéases TIMP-1. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis le niveau de TIMP-1 est évaluée dans les surnageants par technique ELISA. *** $p < 0.001$ vs negative control.

Le BaP augmente significativement le niveau de l'inhibiteur de métalloprotéase TIMP-1, quelle que soit la concentration concernée.

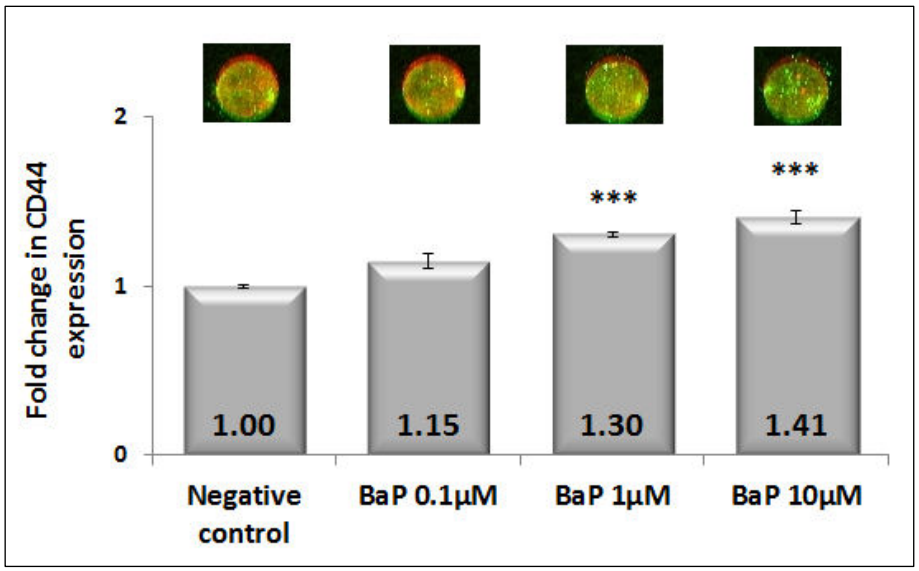


Figure 63. Expression du récepteur CD44. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis l'expression du récepteur CD44 est évaluée par In Cell Western (photos représentant le merge entre le marquage de l'ADN en rouge et le marquage du récepteur CD44 en vert). L'histogramme correspond à la quantification par le logiciel Image J de la fluorescence observée. *** $p < 0.001$ vs negative control.

A 1 µM et 10µM, nous observons une augmentation de l'expression du récepteur membranaire CD44.

Le microenvironnement matriciel est étroitement lié à la migration cellulaire ; nous avons donc voulu savoir si les modifications du microenvironnement matriciel observées après incubation des cellules avec le BaP sont associées à une modification de la migration cellulaire des trophoblastes.

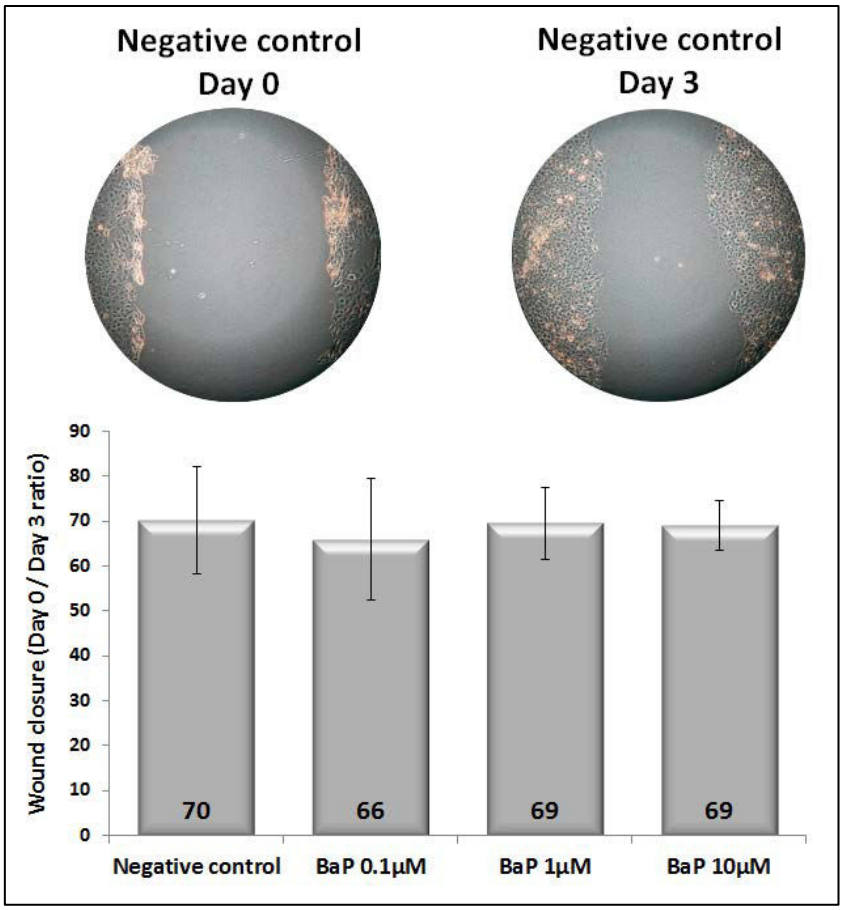


Figure 64. Migration cellulaire. Juste avant incubation des cellules JEG-3 avec le BaP, une « plaie » est réalisée sur le tapis cellulaire (J0) puis les cellules sont incubées avec le BaP et prises en photo 72 heures plus tard (J3). La fermeture de plaie est représentée par le ratio de la surface de la plaie à J0 sur la surface de la plaie à J3. Les surfaces ont été analysées avec le logiciel Image J.

Le BaP n'induit aucune modification de la migration cellulaire après 72 heures d'incubation, quelle que soit la concentration en BaP concernée, par rapport au témoin négatif.

Les modifications du microenvironnement matriciel induites par l'agent carcinogène BaP sur notre modèle ne se traduisent pas par une augmentation de la migration cellulaire. Ceci peut s'expliquer par le piégeage des cellules au sein de la matrice extracellulaire non dégradée et donc plus dense.

Après avoir mis en évidence des modifications du microenvironnement matriciel, nous nous sommes focalisée sur d'éventuelles perturbations du microenvironnement lipidique des cellules.

- **Modifications du microenvironnement lipidique**

Nous avons étudié certains marqueurs membranaires, tels que l'expression de la protéine de jonction serrée Zonula Occludens ZO-1, l'externalisation des phosphatidylsérines, l'expression de la protéine marqueur des cavéoles « lipid rafts domains » Cavéoline-1 ainsi que l'expression et l'activation du récepteur de dégénérescence P2X7.

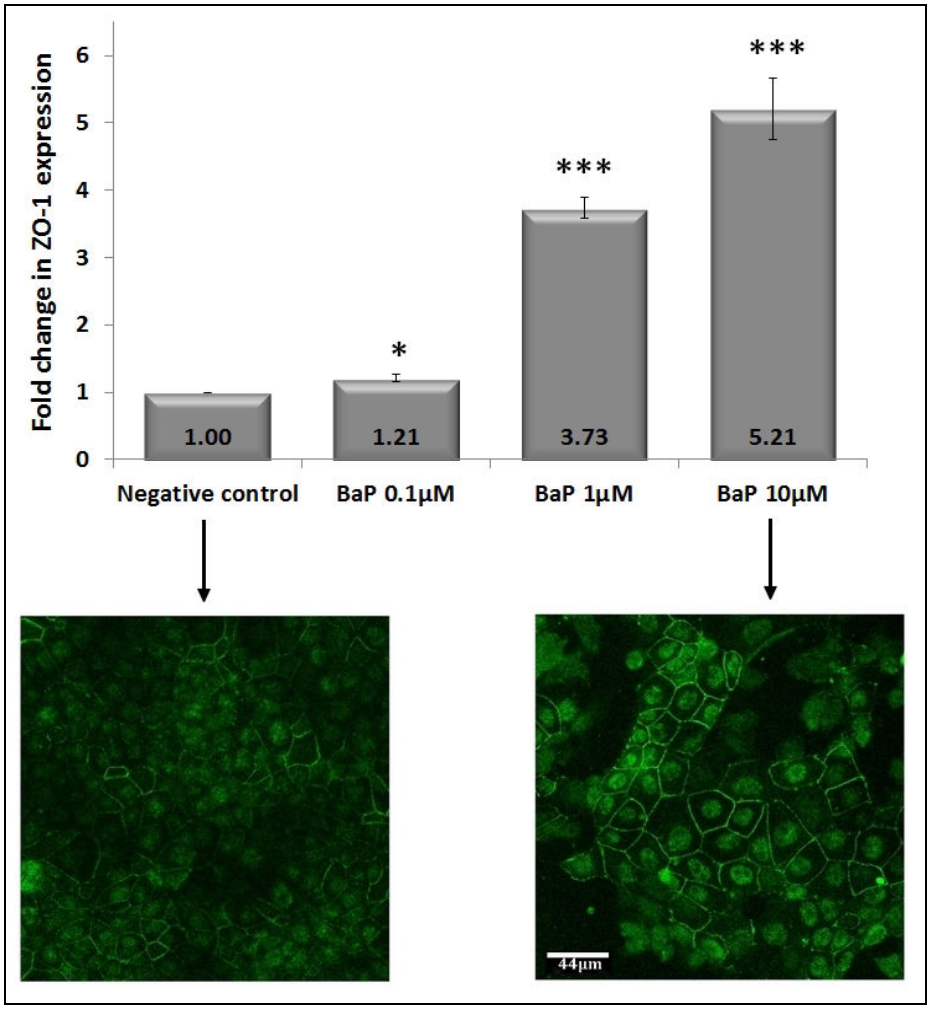


Figure 65. Expression de la protéine ZO-1. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis l'expression de la protéine ZO-1 est évaluée en cytométrie en flux (haut) et marquage immunocytochimique observé en microscopie confocale (bas).

* p< 0,01 ; *** p < 0.001 vs negative control.

L'expression de la protéine ZO-1 est significativement augmentée en In Cell Western dès 0,1µM de BaP après 72 heures d'incubation et ce, de manière concentration dépendante. Ce résultat est confirmé suite au marquage immunocytochimique de la protéine et observation en microscopie confocale où l'on remarque que le marquage de la protéine dans les membranes est plus prononcé en présence de 10µM de BaP que dans le contrôle négatif.

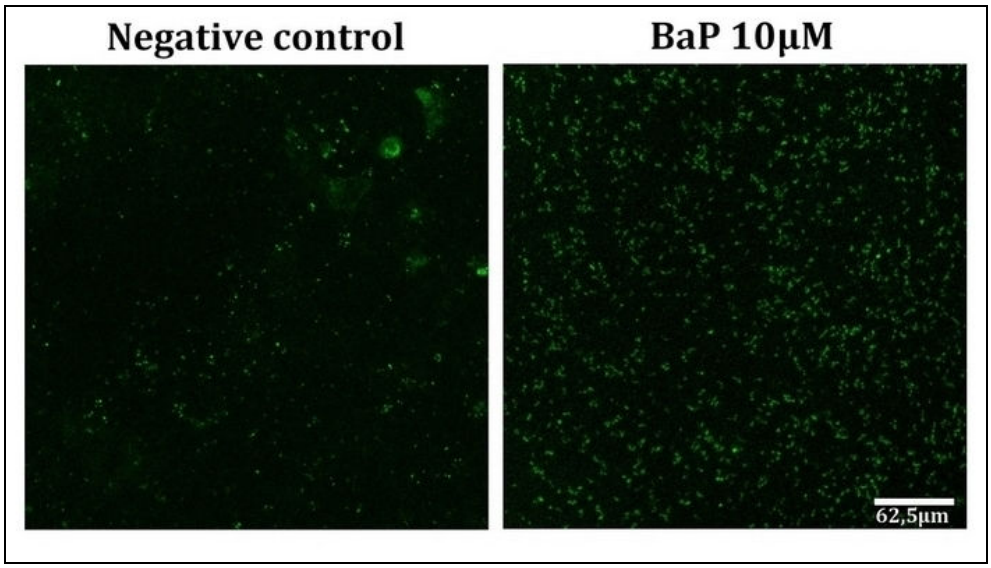


Figure 66. Expression des phosphatidylsérines dans le feuillet externe de la membrane plasmique. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis l'expression des phosphatidylsérines dans le feuillet externe de la membrane plasmique est étudiée en microscopie confocale après marquage à l'annexine V sans perméabilisation des cellules.

Le BaP induit une relocalisation des phosphatidylsérines dans le feuillet externe de la membrane plasmique sans apoptose, ce qui entraine une asymétrie de la membrane.

Notre intérêt s'est ensuite porté sur l'expression de la cavéoline-1, la protéine majeure de zones de la membrane plasmique particulières nommées cavéoles et constituant certains « lipids rafts domains ».

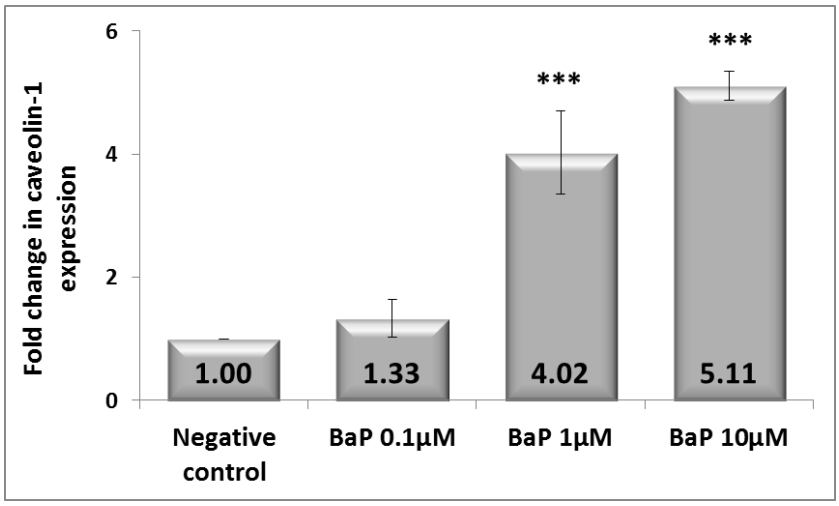


Figure 67. Expression de la protéine Cavéoline-1. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis l'expression de la protéine cavéoline-1 est évaluée en cytométrie en flux. *** $p < 0.001$ vs negative control.

Une augmentation de l'expression de la cavéoline-1 à 1µM et 10µM de BaP est observée après 72 heures d'incubation.

Nous avons par la suite voulu savoir si l'expression du récepteur P2X7 qui est colocalisé avec la protéine cavéoline-1 dans les « lipid raft domains » est également modifiée.

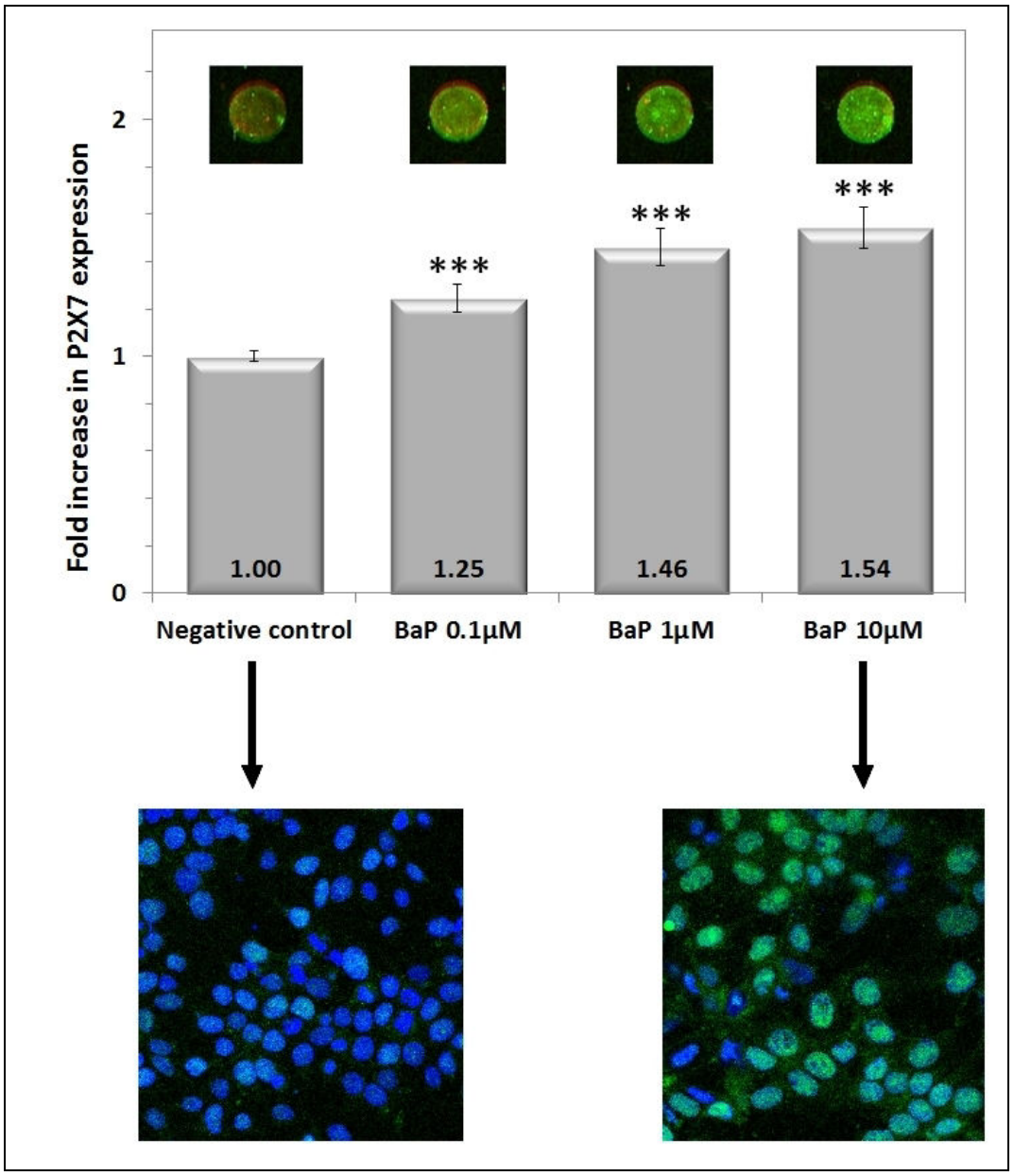


Figure 68. Expression du récepteur P2X7. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis l'expression du récepteur P2X7 est évaluée par In Cell Western (photos du haut représentant le merge entre le marquage de l'ADN en rouge et le marquage du récepteur P2X7 en vert). L'histogramme correspond à la quantification par le logiciel Image J de la fluorescence observée. *** $p < 0.001$ vs negative control. L'expression du récepteur P2X7 est également analysée après marquage immunocytochimique observé en microscopie confocale (photos du bas, ADN marqué en bleu, P2X7 marqué en vert).

L'analyse en In Cell Western montre une augmentation concentration dépendante de l'expression du récepteur P2X7 dès 0,1µM après 72 heures d'incubation. Cette augmentation de l'expression du récepteur P2X7 est confirmée après marquage immunocytochimique observé en microscopie confocale à 10µM.

Nous avons ensuite voulu savoir si l'activité du récepteur P2X7 était également modifiée, dans un premier temps dans sa fonction canal ionique et dans un second temps dans sa fonction de pore de perméation. Pour cela, nous avons tout d'abord dosé le calcium.

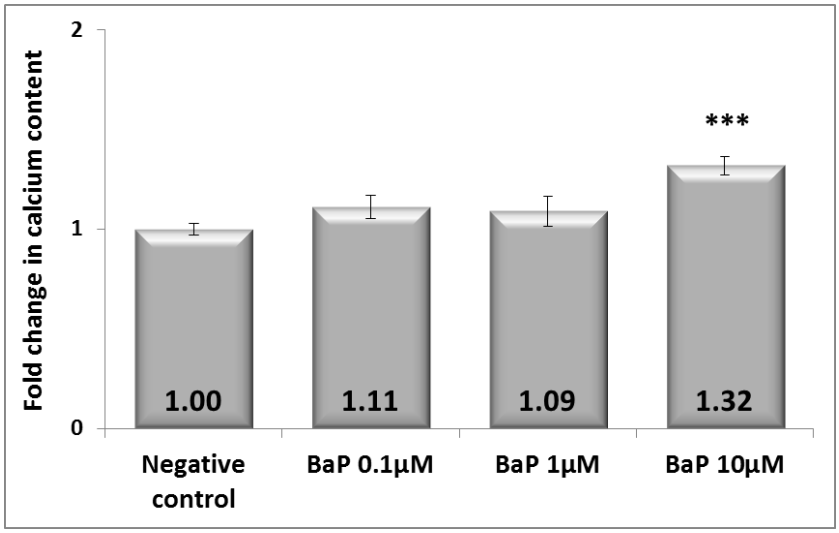


Figure 69. Contenu en calcium. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis le contenu en calcium est évalué par la sonde Fluo-4 en microtitration cytofluorimétrique. *** $p < 0.001$ vs negative control.

Le BaP entraîne une augmentation du contenu en calcium à 10µM après 72 heures d'incubation.

La fonction canal ionique du récepteur P2X7 est donc modifiée. En ce qui concerne sa fonction pore de perméation, nous avons mesuré son ouverture par la sonde YO-PRO-1.

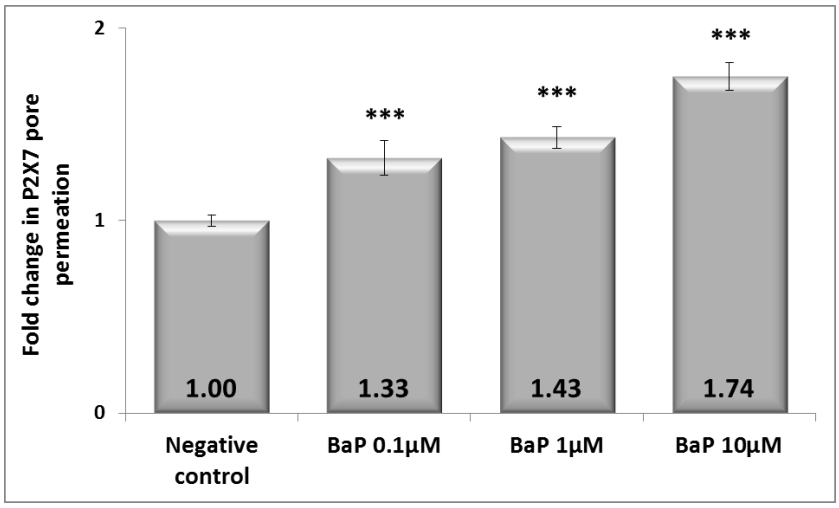


Figure 70. Activation du récepteur P2X7. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP. Le test YO-PRO-1 en microtitration cytofluorimétrique est réalisé afin d'évaluer l'ouverture des pores de perméabilité du récepteur P2X7. *** $p < 0.001$ vs negative control

Une activation concentration dépendante de l'ouverture des pores de perméation P2X7 est observée après 72 heures d'incubation avec du BaP, dès 0,1µM.

Le BaP induit une modification du microenvironnement matriciel et lipidique des cellules placentaires : inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire, augmentation de l'adhésion intercellulaire, rigidification de la membrane plasmique. Ces perturbations s'accompagnent d'une stimulation du récepteur de dégénérescence P2X7. Nous nous sommes donc par la suite intéressée à la dégénérescence cellulaire induite par le BaP sur nos cellules placentaires JEG-3.

- **Voies de dégénérescence cellulaire**

La dégénérescence peut être caractérisée par une diminution de la prolifération cellulaire. Nous avons évalué celle-ci par une numération cellulaire après incubation avec du BaP pendant 4 jours.

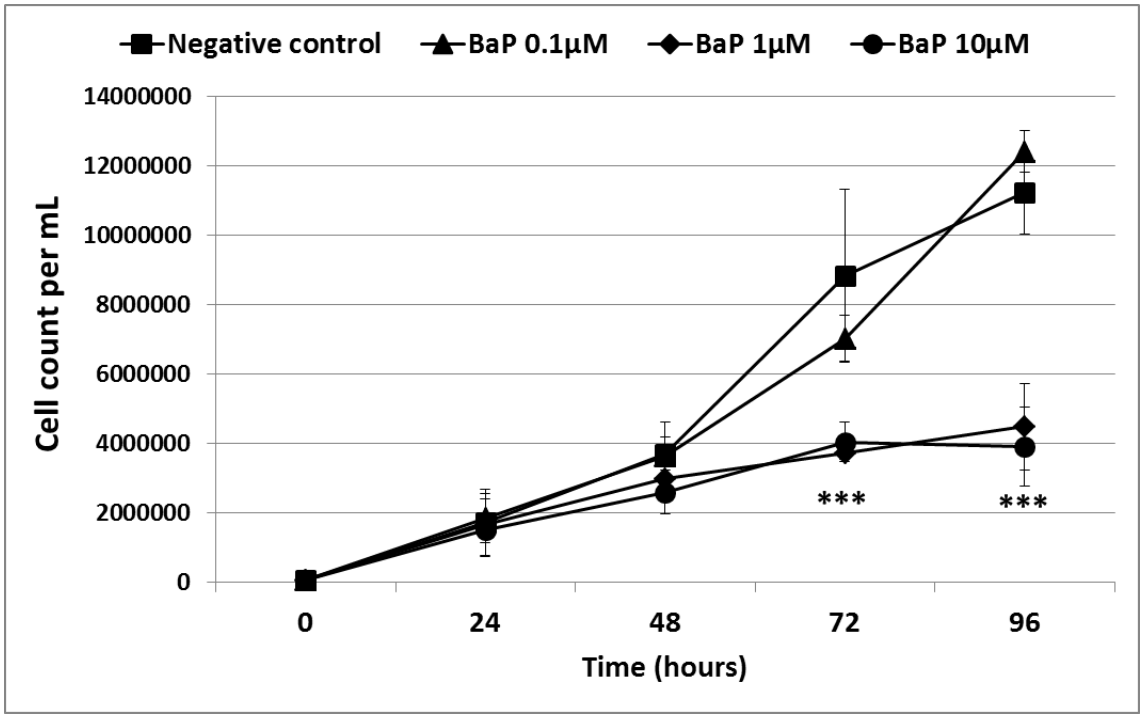


Figure 71. Prolifération cellulaire. Les cellules JEG-3 en phase proliférative sont incubées avec du BaP et sont comptées chaque jour pendant 4 jours. *** $p < 0.001$ vs negative control.

Une diminution de la prolifération cellulaire est observée lorsque les cellules sont cultivées dans du milieu contenant 1µM et 10µM de BaP.

Afin d'en savoir plus sur les mécanismes sous-jacents de cette diminution de la prolifération cellulaire, nous avons étudié le cycle cellulaire.

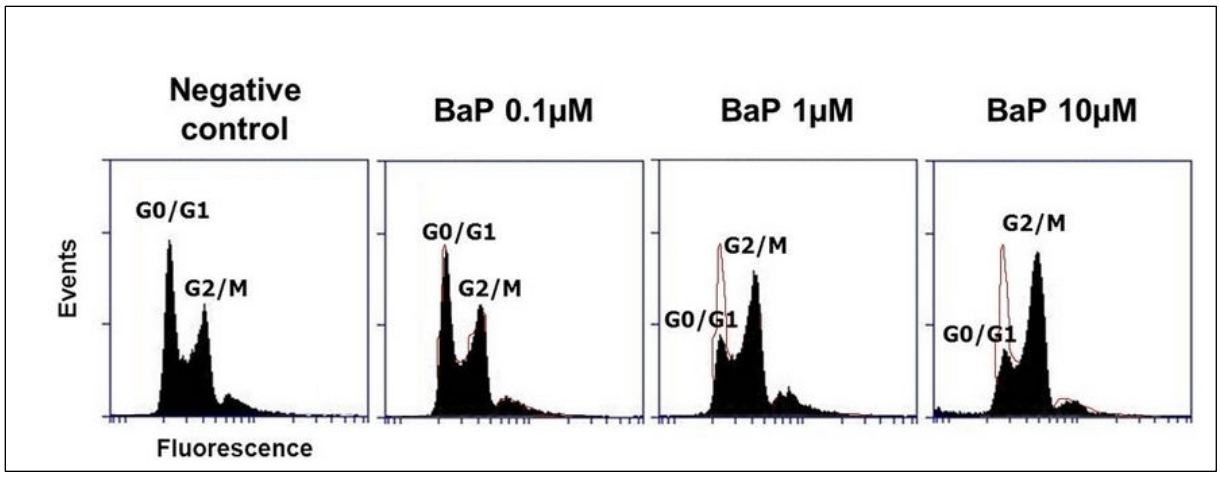


Figure 72. Cycle cellulaire. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis le cycle cellulaire est analysé en cytométrie en flux après marquage de l'ADN à l'iodure de propidium.

Le BaP à 1µM et 10µM entraîne une accumulation des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire après 72 heures d'incubation, en accord avec la diminution de la prolifération cellulaire observée à ces mêmes concentrations.

La phosphorylation de la protéine p53 est associée à des modifications du cycle cellulaire. Nous avons donc évalué la phosphorylation de cette protéine après incubation avec du BaP pendant 24h.

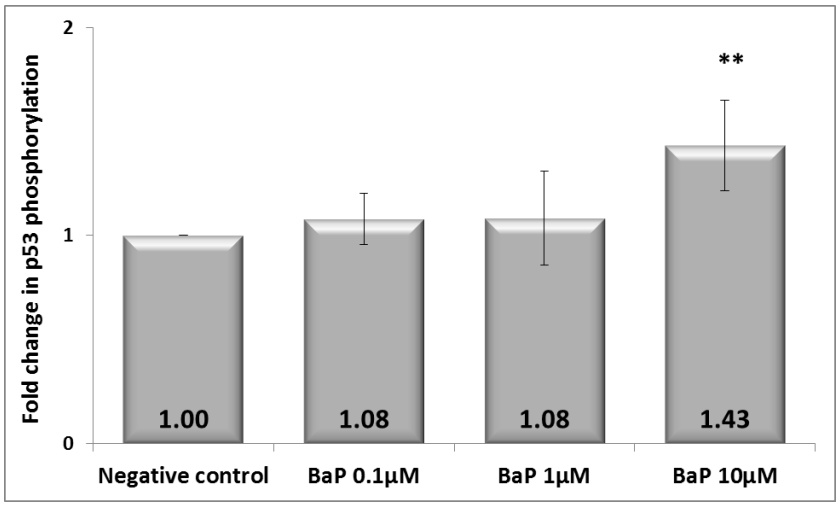


Figure 73. Niveau de protéine p53 phosphorylée. Les cellules JEG-3 sont incubées pendant 24 heures avec du BaP puis le niveau de protéine p53 phosphorylée est évalué par technique ELISA sur extraits cellulaires préalablement réalisés. ** $p < 0.005$ vs negative control.

La phosphorylation de la protéine p53 augmente après incubation pendant 24h avec 10µM de BaP uniquement. A 24h, le BaP ne perturbe pas la prolifération cellulaire, la phosphorylation de p53 est donc antérieure aux altérations de la prolifération cellulaire induites par le BaP.

- **Discussion**

Le BaP est un polluant carcinogène auquel les femmes enceintes et les enfants *in utero* peuvent être exposés. Nous nous proposons de considérer le placenta comme un organe cible de micropolluants, et notamment le BaP. Nous nous sommes donc intéressée à ses effets sur notre modèle de cellules placentaires JEG-3. Celui-ci n'induit aucune perte de viabilité cellulaire jusqu'à 40µM après 72 heures d'incubation ni d'apoptose. De nombreuses données de la littérature sur d'autres modèles cellulaires montrent à des temps ou concentrations inférieurs à ceux de nos conditions expérimentales que le BaP conduit à une diminution du nombre de cellules viables (Dhasmana et al. 2014; Jeffy et al. 2000; Tampio et al. 2008; Zhu et al. 2014). Nos résultats montrent donc que le micropolluant BaP induit des réponses cellulaires spécifiques à notre modèle de cellules placentaires. Pour rappel, nous

avons observé des effets similaires en termes de viabilité cellulaire sur cette lignée trophoblastique et sur les cultures primaires de trophoblastes.

Afin de nous assurer que l'absence d'effets sur la viabilité cellulaire n'était pas due à une absence de métabolisation de ce micropolluant par le modèle cellulaire, nous avons étudié l'activité des CYP1A1 et 1B1, cytochromes permettant la transformation du BaP en métabolites, ainsi que la métabolisation du BaP. L'activité des cytochromes CYP1A1 et 1B1 augmentant après incubation des cellules avec le BaP et ses métabolites étant détectés, nous démontrons que le BaP est métabolisé par la lignée de cellules placentaires JEG-3. Ces résultats sont cohérents avec l'induction de l'expression du CYP1A1 observée sur ce même modèle cellulaire par l'équipe de Zhang *et al.* ainsi que sur d'autres modèles (Galvan et al. 2005; Zhang et al. 1995; Zhang and Shiverick 1997).

La littérature recense que le BaP conduit à des altérations mitochondriales (Bansal et al. 2014; Yang et al. 2011). Sur notre modèle cellulaire à la plus forte concentration (10µM), le BaP induit une baisse de la masse mitochondriale ainsi qu'une augmentation du potentiel transmembranaire mitochondrial. Le BaP est transformé en métabolites oxydés et est connu pour induire des réactions de stress oxydant (C Chen et al. 2013; Ji et al. 2013; Vijayapadma et al. 2014). Nous avons donc étudié certaines réponses médiées par le stress oxydant induites par ce micropolluant sur notre modèle de trophoblastes JEG-3. Nous montrons dans notre étude que le BaP entraîne un phénomène de péroxydation lipidique sur ce modèle cellulaire, ce qui est en accord avec les études déjà réalisées sur un modèle de microsomes placentaires (Byczkowski and Kulkarni 1990) et sur d'autres modèles d'étude (Asha and Girija 2011; Kim et al. 2000; Ramya et al. 2012). De plus, le BaP induit, dans nos conditions expérimentales, une augmentation du glutathion oxydé par rapport au glutathion total, ainsi que l'activation du facteur de transcription NRF-2. Ces réponses, même si elles sont de plus faibles amplitudes que celles données par des modèles cellulaires montrant des effets à des concentration ou temps d'incubation inférieurs (Chung et al. 2007; Huc et al. 2003; Jiang et al. 2011; Zhang et al. 2011), confirment qu'il est important de prendre en compte la réponse cellulaire spécifique aux trophoblastes en tant que cibles potentielles de micropolluants.

Par la suite, nous avons mis en évidence l'augmentation d'expression de la forme phosphorylée de l'histone H2AX, alors nommée γH2AX, dès la plus faible concentration

testée, et de manière concentration dépendante. La phosphorylation de cette histone sur la sérine 139 est déclenchée en cas de cassure double brin de l'ADN et est la première étape de voies de réparation de l'ADN (Kuo and Yang 2008). Des foyers de protéines γH2AX se forment alors au niveau des sites de l'ADN à réparer, ce qui permet le recrutement de protéines de réparation et un remodelage de la chromatine localement. Ainsi, le BaP entraîne des cassures de l'ADN double brin qui sont réparées. Cependant, les mécanismes de réparation de l'ADN n'étant pas totalement fidèles, ils peuvent entraîner des erreurs et ainsi contribuer à la toxicité induite par le BaP. De plus, nous avons montré par une adaptation du test au picogreen que le BaP induit des cassures simples brin de l'ADN après 72 heures d'incubation, aux plus fortes concentrations testées et de manière concentration dépendante. Nous montrons ainsi que le BaP induit des cassures de l'ADN dans nos conditions sur la lignée de trophoblastes JEG-3. Le BaP est largement connu pour induire des dommages à l'ADN, notamment des cassures simples et doubles brin (Einaudi et al. 2014; Garry et al. 2003; Jeng et al. 2013; Tung et al. 2014). Généralement, les tests utilisés pour mettre en évidence les dommages à l'ADN sont les tests d'évaluation des adduits à l'ADN, qui n'ont pas de valeur réglementaire du fait qu'adduit ne signifie pas forcément cassure de l'ADN, et le test des Comètes, réalisé sur cellules humaines ou animales mais dont l'analyse varie selon l'expérimentateur qui a le choix entre différents paramètres pour interpréter les résultats (mesure du contenu en ADN de la tête de la comète ou de la queue, longueur de la queue de la comète, moment de la queue, etc…). Nous proposons ici deux tests reproductibles, facilement réalisables sur cellules humaines ou animales et qui permettent un screening rapide des cassures de l'ADN. L'un, grâce à la technique d'In Cell Western, consiste en un marquage anticorps primaire puis secondaire couplé à un fluorochrome infrarouge suivi de la révélation de la fluorescence sur cellules fixées en microplaque. Ce test nous a permis de mettre en évidence l'augmentation d'expression de la forme phosphorylée de l'histone H2AX, nommée γH2AX. L'autre test consiste en l'adaptation d'un protocole utilisant la sonde Picogreen afin de mettre en évidence les cassures simple brin. Cette sonde fluorescente se liant à l'ADN double brin, toute diminution du signal de fluorescence détecté indique l'apparition d'ADN simple brin et ainsi de cassures de l'ADN. Ainsi, les tests au picogreen et de détection de l'histone γH2AX sont des tests pertinents à utiliser pour détecter l'impact sur l'ADN d'autres micropolluants sur cellules humaines.

Le BaP est référencé en classe 3 des PE, c'est-à-dire qu'aucun élément scientifique ne prouve un effet PE de ce micropolluant mais il est cependant dans la liste des molécules à suivre. Nous avons donc évalué ce potentiel effet PE *via* l'étude de la sécrétion hormonale placentaire induite par le BaP sur notre modèle cellulaire. Nous montrons ici que le BaP n'induit aucune modification de la sécrétion de l'hPL mais augmente celle d'hCG hyperglycosylée. Cette perturbation de la sécrétion hormonale observée nous laisse penser que le BaP exerce un effet PE sur notre modèle cellulaire, effet différent des PE classiques et reconnus tels que le MEHP ou le bisphénol A testés dans un chapitre précédent qui modifient la sécrétion d'hPL mais pas d'hCG hyperglycosylée. Il est à noter que l'hCG hyperglycosylée stimule l'invasion cellulaire et conduit à la formation de tumeurs (Cole et al. 2006a; Cole et al. 2006b). Le BaP, étant une molécule carcinogène, pourrait ainsi exercer une partie de ses mécanismes toxiques carcinogènes via l'augmentation de la sécrétion d'hCG hyperglycosylée. L'hCG est un gène cible du récepteur nucléaire PPARγ (Fournier et al. 2011) et nous avons montré l'activation de ce récepteur par le BaP. Ainsi, le BaP activerait le récepteur PPARγ ce qui aurait pour conséquence l'augmentation de la sécrétion d'hCG hyperglycosylée, qui à son tour pourrait exercer des effets promoteurs.

Le BaP est une molécule lipophile entrant dans la cellule à travers la membrane plasmique après avoir traversé la matrice extracellulaire. Nous nous sommes donc intéressée aux modifications induites par le BaP sur cette dernière. Nous montrons pour la première fois que le BaP augmente le relargage de la protéine TIMP-1, un inhibiteur des métalloprotéases dégradant la matrice extracellulaire. Il a été mis en évidence que la surexpression de la protéine TIMP-1 est associée à des mécanismes de fibrose *via* une augmentation de la densité de la matrice extracellulaire (Adams 2011; Murphy et al. 2002). De plus, nous avons observé une augmentation de l'expression du récepteur CD44, ce qui est en accord avec une étude montrant différentes isoformes de CD44 détectées après incubation de cellules du col de l'utérus avec du BaP (Yan et al. 2010). Les mécanismes de fibrose que nous évoquons sont également associés à une augmentation de l'expression de CD44 (Rampanelli et al. 2014; Reese et al. 2014). Ces données prises dans leur ensemble tendent vers la conclusion que le BaP, bien que ne stimulant pas la prolifération des trophoblastes, pourrait induire la fibrose des tissus environnants, et notamment des villosités placentaires et de la décidue maternelle.

L'état de la matrice extracellulaire est étroitement lié à la migration cellulaire. Le BaP n'induit aucune modification de la migration des cellules sur notre modèle comparativement au témoin négatif. Le BaP étant un carcinogène et les molécules carcinogènes augmentant généralement la migration cellulaire, nous nous attendions à observer une augmentation de celle-ci. Cette absence de modification de la migration cellulaire peut s'expliquer, du moins en partie, par le fait que les trophoblastes possèdent des caractéristiques qui leur sont propres leur permettant de contrôler les mécanismes de carcinogenèse. En effet, les trophoblastes ont des mécanismes de prolifération et migration cellulaires différents des autres types cellulaires du fait de leur caractère transitoire dans l'organisme.

En plus des modifications du microenvironnement matriciel, le BaP entraîne une perturbation du microenvironnement lipidique. En effet, sur notre modèle de cellules placentaires JEG-3, il induit l'externalisation des phosphatidylsérines, phénomène défini dans la littérature comme entraînant une asymétrie de la membrane plasmique (Noble et al. 1999) et l'augmentation de l'expression de la protéine Zonula Occludens ZO-1, ce qui se traduit par plus d'étanchéité de l'épithélium trophoblastique. Nous avons également observé pour la première fois que le BaP entraîne une expression accrue de la protéine marqueur des cavéoles « lipid rafts domains » cavéoline-1. Lagadic-Gossmann *et al.* ont montré que le BaP induit sur des cellules hépatiques la réorganisation de microdomaines riches en cholestérol, ou « lipid raft domains », *via* la diminution de la quantité de cholestérol présente dans les membrane (Tekpli et al. 2010), ce qui a pour conséquence une augmentation de la fluidité membranaire (Collin et al. 2014; Gorria et al. 2006; Liland et al. 2014). Nos travaux viennent compléter les observations de cette équipe concernant les effets du BaP sur le remodelage de la membrane plasmique : le BaP modifie à la fois la composition lipidique mais aussi protéique de ces microdomaines.

Le récepteur de dégénérescence P2X7 voit son expression ainsi que son activation augmentée par le BaP sur notre modèle de cellules placentaires. Nous nous sommes donc intéressée aux voies de dégénérescence cellulaire déclenchées. Ce micropolluant diminue la prolifération cellulaire, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par l'équipe de Shiverick sur ce même modèle cellulaire (Zhang et al. 1995; Zhang and Shiverick 1997). Cette différence de prolifération cellulaire s'explique par l'accumulation des cellules en phase

G2/M du cycle cellulaire que nous avons observée sur les cellules trophoblastiques JEG-3 incubées avec le BaP. Sur d'autres modèles cellulaires, le BaP induit ces mêmes phénomènes cellulaires, à savoir un arrêt du cycle en phase G2/M mais aussi en phase S (Han et al. 2014; Jeffy et al. 2000), ainsi qu'une diminution de la prolifération cellulaire (Wang et al. 2014; Zhao et al. 2012). L'activation chronique du récepteur de dégénérescence P2X7 associée à une diminution de la prolifération des cellules placentaires pourrait à long terme avoir des conséquences non négligeables sur le déroulement de la grossesse.

Grâce à notre modèle cellulaire, nous avons mis en évidence des biomarqueurs d'exposition au BaP : des biomarqueurs hormonaux tels que la sécrétion d'hCG hyperglycosylée, des biomarqueurs de dégénérescence avec l'activation du récepteur P2X7, et des biomarqueurs de stress oxydant tels que la peroxydation lipidique.

3.4. ETUDE DES EFFETS DU BaP SUR LA LIGNEE HACAT

- **Objectif**

Les femmes enceintes peuvent être exposées au BaP par voie cutanée du fait de son ubiquité dans l'atmosphère. Nous avons précédemment mis en évidence des biomarqueurs de risque suite à une exposition au BaP sur un modèle placentaire ; **ces biomarqueurs sont-ils spécifiques au placenta ou peuvent-ils être utilisés pour détecter un risque sur d'autres modèles cellulaires notamment les cellules cutanées ?**

- **Approche expérimentale**

Nous avons évalué la cytotoxicité du BaP sur la lignée de kératinocytes HaCaT aux concentrations utilisées sur les cellules JEG-3.

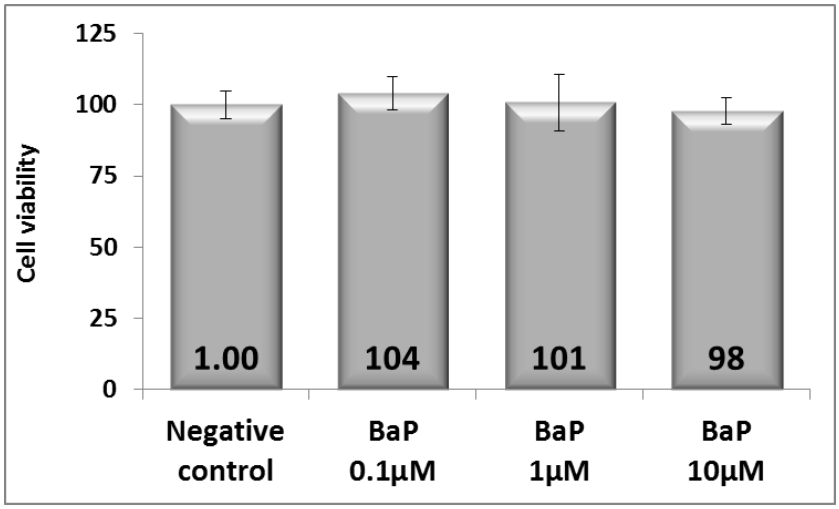


Figure 74. Viabilité cellulaire. Les cellules HaCaT sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis la viabilité cellulaire est évaluée par un test au rouge neutre en microtitration cytofluorimétrique.

Le BaP n'induit aucune perte de viabilité aux concentrations testées après 72 heures d'incubation sur la lignée de kératinocytes HaCaT.

Nous avons ensuite voulu vérifier que le BaP était bien métabolisé par notre lignée cellulaire HaCaT.

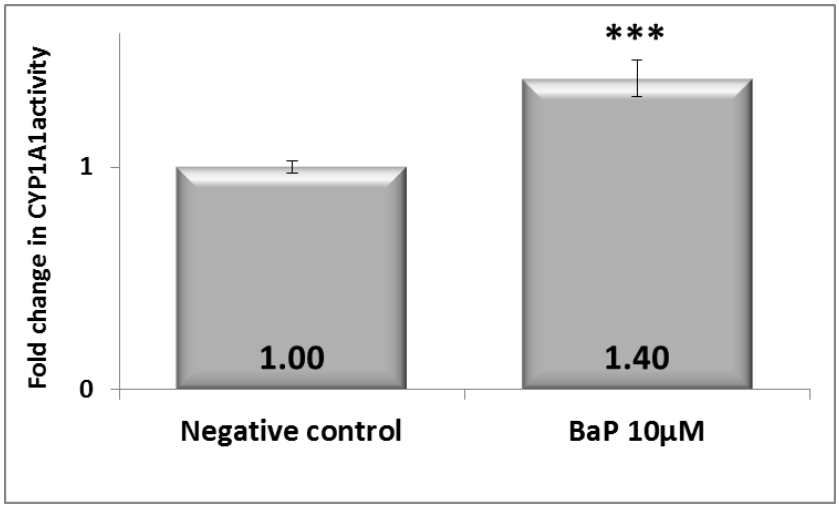


Figure 75. Activité des CYP1A1 et 1B1. Les cellules HaCaT sont incubées pendant 72 heures avec du BaP. L'activité des CYP1A1 et 1B1 est évaluée par la sonde 7-EROD en microtitration cytofluorimétrique. *** $p < 0.001$ vs negative control

Le BaP augmente l'activité des CYP1A1 et 1B1 après 72 heures d'incubation, comme c'est le cas sur la lignée de trophoblastes JEG-3. La lignée de kératinocytes HaCaT induit donc le métabolisme du BaP.

Parmi les biomarqueurs d'exposition précédemment mis en évidence sur les cellules JEG-3, nous avons montré que le BaP induit de la peroxydation lipidique ainsi qu'une ouverture des pores de perméation P2X7.

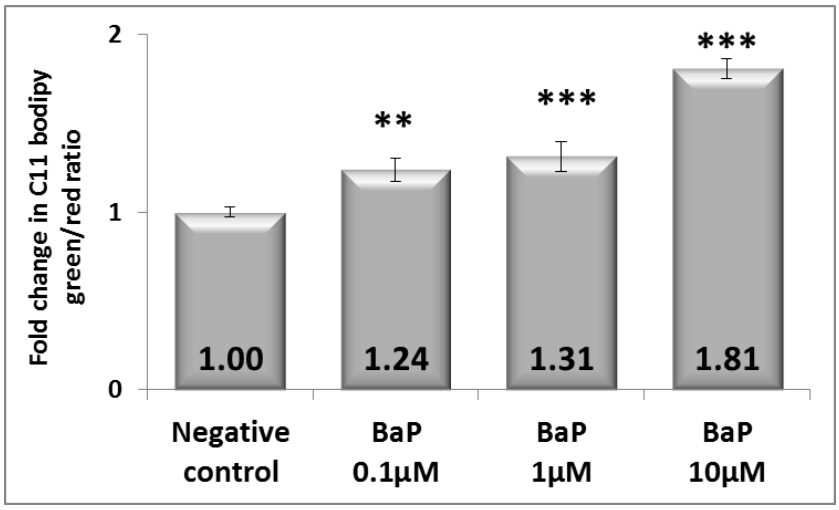


Figure 76. Peroxydation lipidique. Les cellules HaCaT sont incubées pendant 72 heures avec du BaP puis la péroxydation lipidique est évaluée par la sonde C11-bodipy en microtitration cytofluorimétrique. ** p< 0,005 ; *** p < 0.001 vs negative control.

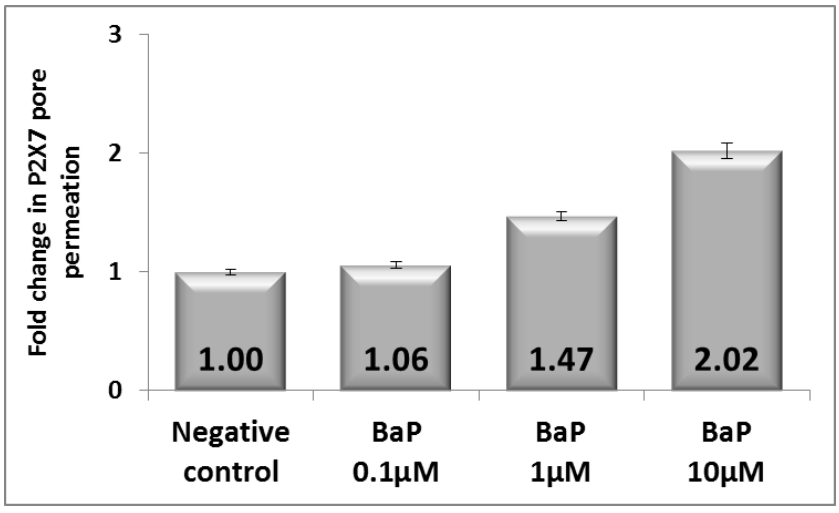


Figure 77. Ouverture des pores de perméation P2X7. Les cellules HaCaT sont incubées pendant 72 heures avec du MEHP. Le test YO-PRO-1 en microtitration cytofluorimétrique est réalisé afin d'évaluer l'ouverture des pores de perméabilité du récepteur P2X7.
*** p < 0.001 vs negative control.

Le BaP induit de la peroxydation lipidique sur le modèle cellulaire HaCaT dès la plus faible concentration testée alors qu'elle n'apparaît qu'à 10µM sur les JEG-3 et active le récepteur de dégénérescence P2X7 à 1 et 10µM.

Un autre biomarqueur d'exposition mis en évidence sur les cellules JEG-3 est la sécrétion hormonale. Nous avons donc évalué celle-ci sur la lignée de kératinocytes.

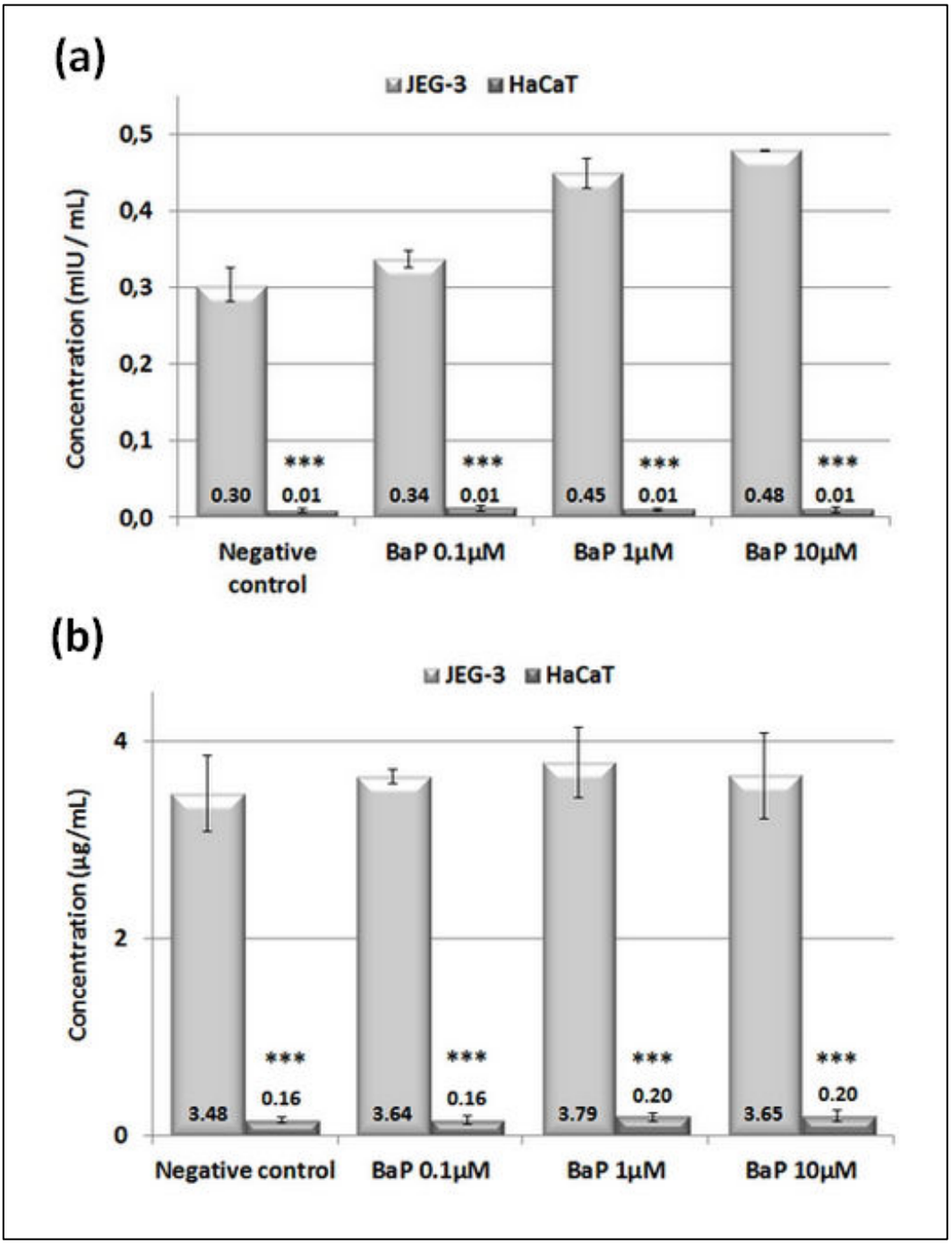


Figure 78. Sécrétion hormonale induite par le BaP. Les cellules sont incubées pendant 72 heures avec du BaP. La sécrétion d'hCG hyperglycosylée (a) et d'hpL (b) est mesurée dans les surnageants cellulaires par la technique ELISA. *** $p < 0.001$ vs condition identique sur lignée cellulaire JEG-3.

Les cellules HaCaT ne sécrètent pas d'hormones placentaires hPl et hCG hyperglycosylée en comparaison aux cellules trophoblastiques.

- **Discussion**

Nous avons identifié certains biomarqueurs d'exposition au BaP sur la lignée de cellules JEG-3 tels que la péroxydation lipidique, l'activation du récepteur P2X7 et l'augmentation de la sécrétion d'hCG hyperglycosylée. Nous nous sommes alors posé la question de la spécificité placentaire de ces biomarqueurs. Pour y répondre, nous avons incubé une lignée de cellules de peau HaCaT avec les mêmes concentrations en BaP que sur la lignée de trophoblastes JEG-3 (0,1µM, 1µM et 10µM) pendant 72 heures. Nous avons montré que le BaP n'induit aucune perte de viabilité sur les cellules cutanées, bien qu'il soit métabolisé par ce modèle cellulaire, comme en atteste l'augmentation d'activité des cytochromes CYP1A1 et 1B1 observée. Ces résultats montrent donc une réponse comparable des deux lignées cellulaires face au BaP en termes de cytotoxicité.

Lors de notre exploration sur les biomarqueurs, nous avons observé que le BaP entraîne la péroxydation lipidique sur les cellules HaCaT après 72 heures d'incubation, quelle que soit la concentration testée. Ainsi, nous mettons en évidence ce biomarqueur de stress oxydant sur les deux types cellulaires étudiés, bien que l'amplitude de réponse soit différente selon le type cellulaire considéré.

Nous observons le biomarqueur de dégénérescence qu'est l'activation du récepteur de dégénérescence P2X7 sur les cellules de peau dans les mêmes amplitudes que sur la lignée de trophoblastes. Ainsi, les biomarqueurs de stress oxydant et de dégénérescence mis en évidence sur la lignée de cellules placentaires JEG-3 sont également retrouvés sur la lignée de cellules de peau HaCaT, ce qui suggère qu'ils seraient des biomarqueurs induits sur d'autres types cellulaires. Ces biomarqueurs pourraient être envisagés pour évaluer non pas l'exposition au BaP mais le risque encouru par les personnes exposées à ce micropolluant, notamment les travailleurs exposés par voie topique sur lesquels des biopsies de peau seraient pratiquées.

Parmi les autres biomarqueurs mis en évidence dans notre étude, nous nous sommes intéressée à la sécrétion hormonale. En comparaison aux cellules trophoblastiques JEG-3, les

cellules cutanées HaCaT ne sécrètent pas d'hormones placentaires hCG hyperglycosylée et hPL. Ainsi, le dosage de la sécrétion hormonale constitue un biomarqueur spécifique de la lignée JEG-3, la lignée cellulaire HaCaT n'étant pas un outil pertinent pour l'étude de la perturbation endocrinienne induite par des polluants.

4. DISCUSSION GENERALE

Le placenta est un organe transitoire car, dérivant de l'embryon, il apparait en début de grossesse et est expulsé au terme de celle-ci lors de la délivrance. Il est nécessaire à la croissance du fœtus et au bon déroulement de la grossesse, et constitue une interface entre la mère et son fœtus. Outre ses rôles nutritifs et endocriniens, il possède une fonction de barrière physiologique pour protéger l'enfant à naître des agressions extérieures. En effet, il exerce un rôle protecteur afin de limiter le passage de molécules vers le fœtus. Le placenta n'est cependant pas totalement imperméable car il est le lieu d'échanges de gaz et de substances et laisse donc au moins passer ces gaz et nutriments. De plus, certains polluants atmosphériques ou alimentaires présents dans la circulation sanguine maternelle peuvent, selon leur solubilité dans le sang et leur poids moléculaire, traverser le placenta et atteindre le fœtus. L'étude de l'impact des polluants au niveau du placenta se base généralement sur sa fonction de barrière placentaire et donc sur son passage de la circulation maternelle à la circulation fœtale.

L'originalité de notre travail repose sur le fait que nous considérons le placenta en tant qu'organe cible de toxiques et non comme une barrière entre la mère et le fœtus comme c'est généralement le cas dans les études sur les polluants. Le placenta est certes un organe transitoire et le fait qu'il soit perméable à certaines substances est important à prendre en compte dans l'étude de la toxicité induite par des polluants mais il est avant tout constitué de cellules qui, comme dans tout tissu, peuvent être altérées, déclencher des mécanismes de réponse, des voies de signalisation et entrer en dégénérescence. Ces données sont à considérer dans les études de la toxicité induite par des polluants et permettent un nouvel angle d'approche lors de telles recherches. Pour ce faire, il est nécessaire d'avoir recours à un modèle cellulaire proche du placenta humain.

L'avantage de notre approche expérimentale est que nos études ont été réalisées sur cellules humaines adhérentes et vivantes. Le placenta humain a ceci de particulier qu'il diffère de tous les autres animaux. Il possède de grandes similitudes avec celui du singe et des rongeurs telles que le fait qu'il est discoïde, hémochorial et décidual, mais possède également des caractéristiques que les rongeurs n'ont pas, comme le fait d'être hémomonochorial, multicotylédonnaire, et d'avoir une surface d'échanges plus développée en comparaison au placenta des rongeurs grâce à des villosités plus arborées et à la

présence de microvillosité à la surface des cellules du syncytium. Le placenta humain possède des caractéristiques morphologiques et physiologiques très proches de celui du singe mais les études sur ce modèle sont très restreintes, pour des raisons éthiques et économiques. En plus de ces différences morphologiques, le placenta humain possède une métabolisation et une régulation hormonale qui lui sont spécifiques. Pour toutes ces raisons, il est nécessaire de travailler sur des modèles de placentas humains pour se rapprocher au plus des conditions d'exposition réelle. Parmi les modèles placentaires existants, le modèle de placenta perfusé est couramment utilisé pour les études de toxicologie basées sur le passage de molécules à travers la barrière placentaire. Ayant choisi de considérer le placenta comme un organe cible de polluant, ce modèle de barrière ne constituait donc pas un modèle adapté à nos études. Nous avons dû explorer d'autres modèles *in vitro* adéquats pour l'étude de la toxicité induite par nos micropolluants sur le placenta. Plus particulièrement, nous avons tout d'abord travaillé sur des cultures primaires de trophoblastes. Bien qu'adapté à nos études de toxicité placentaire, il s'est avéré difficile à obtenir de manière régulière, ce qui a constitué un obstacle non négligeable à notre travail. Nous nous sommes alors tournée vers des lignées de trophoblastes, et notamment la lignée de cellules placentaires BeWo. Nos résultats sur cette lignée ont montré qu'elle n'était pas adaptée à la microplaque, l'un des supports de culture largement utilisé dans les études de toxicologie. En effet, les cellules adhèrent peu et mal à la microplaque, ce qui rend les expérimentations peu reproductibles. De plus, cette lignée est une population hétérogène, constituée de cellules trophoblastiques mononucléées et plurinucléées, ce qui rend difficilement standardisable les tests de toxicologie en microplaque. Afin de remédier à ces problèmes technique et physiologique, nous avons sélectionné la lignée trophoblastique JEG-3 qui est constituée d'une population homogène de cellules mononucléées et que nous avons montrée comme étant adaptée à la microplaque.

Dans le but de nous rapprocher au mieux des conditions d'exposition réelles, nous avons travaillé à des concentrations en micropolluants proches de la réalité physiologique d'exposition. En effet, dans les études cliniques, le MEHP est retrouvé dans l'organisme et plus particulièrement dans le cordon ombilical à des concentrations de l'ordre du micromolaire (Y Huang et al. 2014; Lin et al. 2008; Y Zhang et al. 2009). La gamme de concentrations que nous avons ainsi sélectionnée pour étudier les effets du MEHP sur nos modèles cellulaires est proche de la réalité physiologique. En ce qui concerne le BaP, il est

plus difficile de retrouver la concentration d'exposition car il est très rapidement métabolisé au sein de l'organisme, ce sont donc généralement ses métabolites, notamment le 3-hydroxy-benzo[a]pyrène, qui sont dosés ou les adduits à l'ADN qui sont évalués. Dans les études *in vitro*, il est couramment utilisé à des concentrations d'incubation de l'ordre du micromolaire, et plus précisément à 1 et 10µM (Annas et al. 2000; Yan et al. 2012). Pour notre étude, il nous a fallu identifier des concentrations adéquates *via* une gamme de concentrations de BaP. Les concentrations que nous avons ainsi pu identifier comme non cytotoxiques sont de l'ordre du micromolaire, en accord avec la littérature.

En comparaison avec les données issues de la littérature sur des cellules hépatiques, de veine de cordon ombilical, de sein ou de poumon (Ban et al. 2014; Chen et al. 2012; Dhasmana et al. 2014; Jeffy et al. 2000; Tampio et al. 2008; Zhu et al. 2014), les cellules trophoblastiques JEG-3 ont montré une réponse différente face aux micropolluants testés, notamment en termes de viabilité cellulaire avec le BaP et le MEHP ou d'altérations mitochondriales avec le MEHP. Cette même lignée JEG-3 a cependant répondu de façon similaire à d'autres types cellulaires, tels que les cellules pulmonaires ou les érythrocytes, comme en attestent les réactions de stress oxydant (C Chen et al. 2013; Ramya et al. 2012; Vijayapadma et al. 2014) et les cassures de l'ADN simple et double brins connues pour être induites par le BaP (Rossner et al. 2014). Nous avons révélé ces cassures de l'ADN *via* l'utilisation de deux tests peu répandus et n'ayant jamais été utilisés sur notre modèle cellulaire : la sonde picogreen pour les cassures simple brins et la technique d'In Cell Western évaluant la phosphorylation de l'histone H2AX en γH2AX pour les cassures double brins. Ces deux tests apparaissent pertinents pour détecter l'impact sur l'ADN de micropolluants en général sur cellules humaines. Les réponses différentes mais aussi comparables à d'autres types cellulaires détectées après incubation des cellules JEG-3 avec les micropolluants nous ont permis de révéler la complexité de placenta en tant qu'organe et plus particulièrement de ses cellules. L'importance d'étudier l'impact de polluants sur ce type cellulaire apparaît évidente. De plus, nous avons mis en exergue que la lignée de trophoblastes JEG-3 possède des marqueurs spécifiques tels que la sécrétion des hormones hPL et hCG hyperglycosylée qui la différencient d'autres types cellulaires, comme la lignée de cellules de peau HaCaT que nous avons testée. Ces données montrant ainsi une réponse spécifique des trophoblastes JEG-3 face aux micropolluants testés en font donc un modèle

d'étude pertinent et cohérent qu'il serait intéressant d'inclure dans les études de toxicologie.

Les tests référencés permettant l'évaluation du potentiel PE de molécules sont généralement des tests acellulaires réalisés afin de déterminer la liaison d'une molécule sur les récepteurs androgénique et/ou oestrogénique. Il existe également d'autres tests couramment utilisés qui s'intéressent à l'activation ou l'inhibition de ces récepteurs chez la levure ; ce sont les tests « Yeast Estrogen Screen » (YES) et « Yeast Androgen Screen » (YAS). Ces tests standardisés et largement utilisés sont donc soit acellulaires soit réalisés chez la levure. Par extrapolation à l'Homme, ils permettent de détecter des mécanismes qui pourraient avoir lieu dans la cellule humaine. Cependant, le risque de conclure à des faux positifs existe. En effet, dans la cellule, l'activation ou l'inhibition des récepteurs oestrogéniques et androgéniques mis en évidence par ces tests n'aboutissent pas forcément à une perturbation endocrinienne. Or, la définition même d'un PE est d'induire une perturbation hormonale et donc potentiellement de la sécrétion hormonale. Il est donc paradoxal que cette étape soit relativement peu ciblée dans les tests standardisés d'évaluation des PE. Par voie de conséquence, il nous a paru intéressant de mettre au point des tests d'évaluation de l'effet PE induit par des molécules en étudiant la sécrétion hormonale, qui est l'un des maillons centraux de la chaine endocrinienne.

Les études cliniques ont montré qu'une modification de la sécrétion d'hormones placentaires telles que l'hPL ou l'hCG est associée à des pathologies de la grossesse telles que la prééclampsie ou la souffrance fœtale (Bersinger and Odegard 2004; Feng et al. 2000; Merviel et al. 2001; Zwahlen et al. 2007). Les PE pouvant par définition modifier la sécrétion hormonale, nous avons utilisé notre modèle de cellules placentaires JEG-3 afin de mettre en évidence *in vitro* l'effet PE de molécules référencées en classe 1 de perturbation endocrinienne. Nous avons ainsi observé après incubation des cellules trophoblastiques JEG-3 avec le MEHP et le bisphénol A une augmentation de la sécrétion d'hPL. Le BaP, quant à lui, est référencé parmi les molécules pour lesquelles aucune preuve n'affirme un potentiel PE mais est à suivre pour un potentiel effet PE. Sur notre modèle cellulaire, il augmente la sécrétion d'hCG hyperglycosylée. Ainsi, grâce au dosage de ces deux hormones placentaires, nous avons réussi à mettre en évidence l'effet PE de molécules reconnues comme telles ou suspectées. Toute modification de la sécrétion des hormones placentaires, augmentation ou

diminution, peut avoir un impact important sur le déroulement de la grossesse. En effet, l'hPL est une hormone impliquée dans la préparation de la glande mammaire à la lactation (Walker et al. 1991) et dans le phénomène d'insulinorésistance de la mère ayant pour objectif d'augmenter l'apport en nutriments au fœtus (Newbern and Freemark 2011). Une modification de la sécrétion d'hPL par le placenta pourrait donc avoir de graves conséquences sur la nutrition du fœtus et ainsi sur son développement. Dans le cas de l'hormone hCG, il existe une différence de conséquences entre des modifications de sécrétion de la forme hyperglycosylée d'hCG et de la β-HCG dans la littérature. En effet, la sous-unité β-HCG est connue pour induire la différenciation des cellules trophoblastiques lors de la grossesse physiologique (Le Vee et al. 2014). La forme hyperglycosylée de l'hormone hCG est quant à elle associée à une pathologie de la grossesse, la prééclampsie, mais stimule également l'invasion cellulaire et conduit à la formation de tumeurs (Bourdiec et al. 2013; Cole 2012; Cole and Butler 2012). Ainsi, l'augmentation de la sécrétion d'hCG hyperglycosylée induite par le BaP pourrait potentiellement médier une partie de ses effets promoteurs.

Une activation des récepteurs androgéniques et/ou oestrogéniques est souvent induite par les PE, nous avons dosé les hormones hPL et hCG hyperglycosylée après incubation des cellules JEG-3 avec des activateurs de ces récepteurs, afin de définir un profil oestrogénique ou androgénique mimétique de nos PE. Le profil hormonal des PE que nous avons testés diffère de celui de la testostérone (activateur du récepteur androgénique) et du 17β-œstradiol (activateur oestrogénique). La testostérone ne modifie pas la sécrétion hormonale, tandis que le 17β-œstradiol augmente la sécrétion des deux hormones. Les mécanismes de perturbation endocrinienne induits par les PE testés sur notre modèle semblent donc être des mécanismes plus complexes que ceux auxquels nous nous attendions. De plus, au vu de la différence d'amplitude d'augmentation de la sécrétion des hormones placentaires avec le 17β-œstradiol et nos micropolluants, il semblerait que la constante d'affinité du MEHP, du bisphénol A et du BaP sur le récepteur oestrogénique soit inférieure à celle du 17β-œstradiol, ce qui confirme des données précédemment publiées sur des modèles acellulaires (Blair et al. 2000; Yiu et al. 2014) et renforce l'intérêt d'avoir recours à la lignée cellulaire JEG-3 dans les études sur les PE.

Nous sommes ainsi au début d'une nouvelle approche d'étude des PE et il pourrait être intéressant d'ajouter le dosage de ces deux hormones placentaires à la batterie de tests déjà

existants pour évaluer le danger de molécules potentiellement PE. Dans l'industrie du plastique, il est urgent de trouver des tests d'évaluation en ce qui concerne les plastifiants présents sur le marché et ceux à venir. En effet, les femmes enceintes peuvent être exposées aux plastifiants présents dans les dispositifs médicaux tels que les lignes et poches de perfusion, drains, voies d'abord veineuses ou artérielles et cathéters, en cas d'hospitalisation lors de leur grossesse. Or, ces dispositifs médicaux contiennent généralement du DEHP. Cette molécule étant faiblement liée à la matrice, elle peut s'en détacher (United States Food And Drug Administration 2001), migrer dans le sang maternel, atteindre le placenta et se retrouver dans le sang fœtal. Afin de limiter une telle exposition aux femmes enceintes et aux enfants hospitalisés en néonatalogie ou pédiatrie, l'article LS214-1 de la loi 2012-1442 votée par le sénat interdit spécifiquement l'utilisation du DEHP dans les dispositifs médicaux utilisés dans ces services à partir du 1er juillet 2015. Nos tests de dosages hormonaux sont rapides à réaliser, reproductibles et permettent le screening de plusieurs molécules en parallèle ; réalisés en microplaque, ils peuvent être automatisables donc industrialisables pour permettre le screening d'une grande quantité de molécules à discriminer. Outre la détection du potentiel PE des molécules de remplacement du DEHP dans les dispositifs médicaux, ces tests pourraient être utilisés dans l'industrie des pesticides. Alors que jusqu'en juin 2014, les réglementations européennes 1107/2009 et 528/2012 sur les pesticides et biocides classaient un produit comme risqué dès qu'un danger de perturbation endocrinienne était mis en évidence, sans même nécessiter une évaluation de l'exposition, une nouvelle feuille de route exige à présent de prendre en compte l'exposition à ces molécules (European Comission 2014a). Dans ce cadre, il serait essentiel de trouver un test rapide pour déterminer le danger. Nos tests permettraient d'obtenir des informations concernant le danger des pesticides testés. Les biomarqueurs de perturbation endocrinienne que nous avons identifiés, soit les sécrétions d'hPL et d'hCG hyperglycosylée, sont dosables dans le sérum maternel. Ils pourraient alors être également envisagés en tant que biomarqueurs d'effet et non plus de danger comme nous venons de l'évoquer dans l'évaluation de nouveaux plastifiants et pesticides.

Dans le cas des phytoestrogènes, le problème se pose lorsqu'ils sont évalués par les tests de binding qui mesurent la liaison aux récepteurs oestrogéniques ERα et ERβ. Or, les phytoestrogènes telle que la génistéine ont une plus grande affinité pour le récepteur ERβ que pour le récepteur ERα (An et al. 2001). L'activation de ces deux récepteurs aboutit à des

réponses antagonistes : le récepteur ERα stimule la prolifération cellulaire et donc peut induire des cancers, tandis que le récepteur ERβ l'inhibe (Liu et al. 2002; Rizza et al. 2014). Les phytoestrogènes risqueraient d'être classés PE à risque avec les tests de binding alors que l'activation du récepteur ERα serait contrebalancée par l'activation plus forte du récepteur ERβ. En étudiant directement la sécrétion hormonale après incubation des cellules trophoblastiques JEG-3 avec les phytoestrogènes, il serait possible de conclure plus certainement sur le potentiel effet PE des molécules testées.

Le placenta étant par ailleurs un tissu riche en macrophages (Ben Amara et al. 2013; Houser 2012; Mues et al. 1989), il semble important d'évaluer des marqueurs différents des modifications hormonales. Nous avons alors étudié l'impact des PE, et plus particulièrement du MEHP, sur ces cellules impliquées dans la réaction inflammatoire et les mécanismes de protection du placenta. Nos travaux ont permis de révéler des altérations mitochondriales induites par ce micropolluant. L'organisme y étant exposé de façon chronique, les perturbations mitochondriales énergétiques que nous avons observées sur ce modèle pourraient à long terme entrainer des altérations importantes du système immunitaire. En outre, nous avons montré pour la première fois que le MEHP induit l'activation du récepteur de dégénérescence P2X7, conduisant à la formation de pores de perméation. Dans la littérature, l'activation de ce récepteur est un élément indispensable à la formation de l'inflammasome, un complexe oligomérique impliqué dans la réponse inflammatoire dont une des fonctions est la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNF-α, que nous avons vu augmenter après incubation des macrophages avec le MEHP. Il a été montré chez la femme enceinte que les niveaux de ces deux cytokines pro-inflammatoires sont augmentés dans le liquide amniotique en cas d'inflammation du chorion ou de travail prématuré (Arntzen et al. 1998) ainsi que dans les cas de prééclampsie. De plus, l'inflammation chronique des villosités placentaires est associée à des fausses couches à répétition (Doss et al. 1995; Kohut et al. 1997). Par conséquent, les PE, en particulier le MEHP que nous avons étudié, pourraient conduire à une réaction inflammatoire chronique au niveau du placenta, ayant ainsi de graves conséquences sur le déroulement de la grossesse.

En plus de mettre en évidence des biomarqueurs de perturbation endocrinienne, nous avons également détecté un biomarqueur de dégénérescence des cellules placentaires après

exposition aux micropolluants testés : l'activation du récepteur de dégénérescence P2X7. Le récepteur P2X7 est un récepteur membranaire impliqué dans des pathologies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie d'Huntington ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Diaz-Hernandez et al. 2009; Gu et al. 2013; McLarnon et al. 2006; Parvathenani et al. 2003). En clinique, il existe des phénomènes d'atrophie placentaire dans certains cas de grossesse pathologique. Elle consiste en la dessiccation du placenta et en son rétrécissement et peut être apparentée à de la dégénérescence. Ici, nous montrons que le BaP et le MEHP induisent l'activation du récepteur de dégénérescence P2X7. L'activation chronique de ce récepteur, par exemple sur plusieurs mois dans le cas de la grossesse, pourrait induire la dégénérescence du placenta et ainsi entraîner des mécanismes d'atrophie placentaire, ayant ainsi de graves conséquences sur le devenir de l'enfant à naître. L'activation du récepteur P2X7 constitue un biomarqueur de risque suite à l'exposition aux micropolluants testés. Néanmoins, l'analyse de ce biomarqueur nécessite une biopsie placentaire, qui reste à l'heure actuelle un geste invasif et risqué pour la suite de la grossesse. Dans le futur, si des techniques moins risquées pour le déroulement de la grossesse sont mises au point, l'étude de ce biomarqueur de dégénérescence pourra permettre de détecter des altérations du placenta.

Outre son intérêt pour dépister des dégénérescences placentaires dans le futur, le biomarqueur P2X7 pourrait avoir une application qui ne concerne pas directement le placenta mais qui est envisageable au présent. En effet, nos travaux ont permis de révéler ce biomarqueur ainsi que la peroxydation lipidique sur des cellules de peau après incubation avec le BaP. Associé au biomarqueur de peroxydation lipidique, le biomarqueur de dégénérescence P2X7 pourrait être recherché sur des biopsies de peau chez les travailleurs quotidiennement exposés au BaP. Ainsi, ces biomarqueurs pourraient participer à l'évaluation du risque encouru par ces travailleurs à travers cet examen qui pourrait être réalisé lors du suivi médical. Ces tests constitueraient ainsi une perspective intéressante dans le cadre de la médecine du travail pour le suivi des travailleurs exposés au BaP.

Le BaP est un carcinogène connu et peut atteindre le placenta. Le risque pour la grossesse est d'autant plus élevé qu'il est présent dans l'air ambiant *via* des sources d'origine variée. Comme nous l'avons décrit précédemment, le BaP est peu étudié comme

agent toxique pour le placenta en tant qu'organe. Il nous est apparu alors important d'évaluer les conséquences d'une telle exposition à l'aide de notre modèle de cellules trophoblastiques JEG-3. Nous nous sommes heurtée à une difficulté technique liée au fait que cette molécule est autofluorescente dans l'UV (λ excitation = 380nm) (Moore and Cohen 1978). Par conséquent, il nous a fallu adapter nos tests à ce paramètre, notamment en ce qui concerne l'évaluation de l'apoptose. En effet, le test le plus couramment utilisé pour évaluer la condensation de la chromatine est le test au Hoechst 33342, qui est une sonde fluorescente dans l'UV. Afin de contourner le problème d'autofluorescence du BaP dans l'UV, nous avons alors recherché un autre test adapté à l'évaluation de la condensation de la chromatine. Le test Nuclear-ID® (Enzo Life Sciences) , basé sur le même principe que le test au Hoechst 33342, nous a permis d'étudier ce paramètre d'apoptose avec une sonde fluorescente dans le visible. Nous avons pu en conclure, en complément de l'analyse de la fragmentation de l'ADN, que le BaP n'induit pas d'apoptose sur les cellules placentaires, dans nos conditions expérimentales. Ces résultats sont en accord avec le caractère carcinogène du BaP.

La matrice extracellulaire est une composante à importance majeure dans le cas de la carcinogenèse. En effet, elle sert de support à la migration des cellules et les molécules qui la composent peuvent exercer des actions sur les cellules afin de modifier leur état. Ainsi, la carcinogenèse est associée à un remodelage de la matrice extracellulaire (Alexandrova 2008; Nagle 2004) et l'augmentation d'expression du récepteur CD44 est un marqueur d'invasion cellulaire en cas de cancer dans les études cliniques (Du et al. 2008; Wang et al. 2009). Nous avons mis en évidence pour la première fois que le BaP augmente le relargage de la protéine matricielle TIMP-1 par les cellules placentaires JEG-3 et l'expression du récepteur CD44. La protéine TIMP-1 est un inhibiteur des métalloprotéases qui ont pour rôle la dégradation de la matrice extracellulaire. D'une part, l'augmentation de sa sécrétion rend le réseau de matrice extracellulaire plus dense, et d'autre part par l'expression accrue du récepteur CD44 favorise la fixation des polymères d'acide hyaluronique sur les cellules. Sur notre modèle de cellules placentaires JEG-3, nous n'observons aucune modification de la migration cellulaire avec le BaP, ce qui va à l'encontre de ce à quoi nous nous attendions (Larue and Bellacosa 2005; Yamaguchi et al. 2005). Cette absence de migration s'expliquerait par le fait que le placenta peut être considéré comme une tumeur dont la prolifération et la migration sont

contrôlées durant la grossesse par les trophoblastes *via* des mécanismes et voies de signalisation spécifiques.

Dans la littérature, il a été montré que l'augmentation de la densité de matrice extracellulaire induite par la surexpression de la protéine TIMP-1 est associée à des mécanismes de fibrose (Adams 2011; Murphy et al. 2002). Or, il est publié qu'une augmentation d'expression du récepteur CD44 est là aussi associée aux mécanismes de fibrose (Rampanelli et al. 2014; Reese et al. 2014). Ainsi, bien que le BaP ne stimule pas la prolifération des cellules trophoblastiques sur notre modèle, il pourrait, *via* l'augmentation du relargage de TIMP-1 et de l'expression du récepteur CD44, induire une fibrose des villosités placentaires mais également des tissus environnants tels que la décidue maternelle.

En plus d'induire des perturbations du microenvironnement matriciel, le BaP conduit également à des modifications du microenvironnement lipidique. Sur notre modèle de trophoblastes JEG-3, le BaP induit l'externalisation des phosphatidylsérines, mécanisme induisant une asymétrie de la membrane plasmique (Noble et al. 1999), et l'augmentation de l'expression de la protéine Zonula Occludens ZO-1, qui a pour conséquence d'augmenter l'étanchéité de l'épithélium de cellules trophoblastiques. Nous avons également mis en évidence que le BaP accroit l'expression de la cavéoline-1, une protéine marqueur des cavéoles « lipid raft domains ». Une équipe a observé sur un autre modèle cellulaire que le BaP conduit à la réorganisation des « lipid raft domains » en diminuant la quantité de cholestérol (Tekpli et al. 2010), augmentant ainsi la fluidité membranaire. Nos travaux complètent ces résultats en mettant en évidence que le BaP modifie la composition lipidique des « lipid raft domains » mais aussi sa composition protéique. De nombreuses protéines de signalisation cellulaire essentielles à la survie des cellules, telles que les récepteurs aux facteurs de croissance, sont présentes dans ces microdomaines membranaires. Toute modification de ces microdomaines, tant au niveau de la composition lipidique que protéique, représente un risque pour le développement fœtal. Nous avons ainsi montré que, le placenta étant un organe constitué de cellules, il peut subir des altérations de son microenvironnement matriciel et lipidique, ce qui pourrait avoir de graves conséquences sur le développement de l'enfant à naître mais également sur la décidue maternelle.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nos travaux de recherche apportent un nouvel angle d'approche aux études de toxicité induite par des polluants en prenant en compte que le placenta n'est pas uniquement une barrière physiologique entre la mère et son fœtus mais également un organe pouvant être la cible de molécules toxiques. Grâce à notre modèle de cellules placentaires JEG-3, il est possible de mettre en évidence un risque pour le fœtus mais également pour la mère suite à une exposition à certains polluants. Ainsi, nos résultats permettent de mieux comprendre certaines observations cliniques. En effet, il est connu que des perturbations de la grossesse telles que la prééclampsie ou la souffrance fœtale sont associées à une modification de la sécrétion des hormones placentaires hCG hyperglycosylée et hPL (Fig. 80). Nous avons associé ces modifications de la sécrétion des hormones placentaires à une exposition aux PE, qui peuvent donc être responsables de certaines grossesses pathologiques observées en clinique comme la prééclampsie ou la souffrance fœtale. De plus, l'atrophie placentaire étant un phénomène de dégénérescence cellulaire, notre biomarqueur de dégénérescence P2X7 permet *in vitro* de détecter ces altérations placentaires.

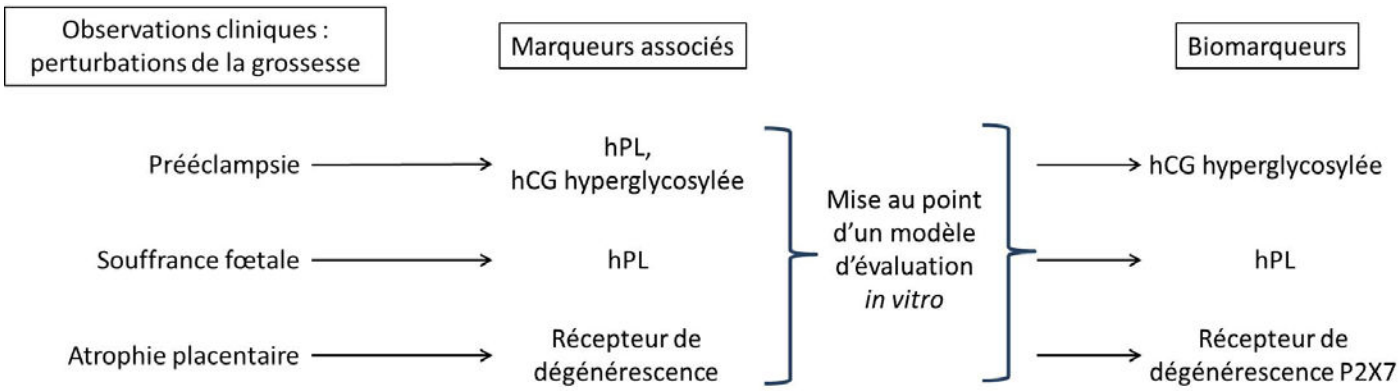


Figure 79. Observations cliniques et biomarqueurs associés

Selon le cas, ces biomarqueurs peuvent à la fois être des biomarqueurs de risque mais également de danger. En effet, lorsque ces biomarqueurs sont dosés dans le sang des

femmes enceintes ou sur des biopsies de peau de travailleurs exposés aux polluants, ils permettraient l'évaluation du risque encouru après exposition. Dans le cas des études réglementaires pour l'évaluation de la toxicité placentaire de nouvelles molécules, ces biomarqueurs donneraient des informations essentielles sur le danger que représentent ces molécules.

La lignée cellulaire trophoblastique JEG-3 associée aux biomarqueurs de sécrétion hormonale est ainsi un outil pertinent pour l'étude de la perturbation endocrinienne des polluants, et plus particulièrement ceux soupçonnés d'être PE. La loi 2012-1442 adoptée par le sénat en 2012 interdit l'utilisation du bisphénol A et autres PE et substances cancérogènes dans les dispositifs médicaux destinés aux bébés et aux femmes enceintes. Plus particulièrement, l'article L5214-1 interdit l'utilisation du DEHP dans les dispositifs médicaux en pédiatrie, néonatalogie et dans les maternités à partir de juillet 2015. Dans ce cadre, il est de grande importance de trouver des molécules de remplacement aux plastifiants déjà présents sur le marché. Parmi les molécules plastifiantes de remplacement suggérées pour remplacer le DEHP dans les dispositifs médicaux, il existe les di-isononyl-phtalate (DINP) qui sont des phtalates moins toxiques ainsi que les DINCH® qui sont une nouvelle famille de plastifiants. Il serait judicieux de tester le potentiel PE, sur notre modèle de cellules placentaires JEG-3, de ces molécules de remplacement avant leur mise sur le marché, en association avec des tests de cytotoxicité afin de s'assurer de leur innocuité. Afin de compléter le profil hormonal des PE reconnus et des molécules potentiellement PE, il semble pertinent d'ajouter le dosage d'autres hormones placentaires. Parmi les protéines dosables, la progestérone, l'hormone de croissance placentaire ainsi que la protéine-A plasmatique associée à la grossesse (Pregnancy Associated Plasma Protein-A, PAPP-A) semblent intéressantes. La progestérone est synthétisée à partir du cholestérol circulant maternel et a pour fonctions de maintenir la grossesse en agissant au niveau de l'utérus ainsi que d'induire la différenciation des glandes mammaires. L'hormone de croissance placentaire exerce un rôle sur le métabolisme maternel, en favorisant l'apport nutritionnel à l'enfant et la PAPP-A est utilisée en tant que marqueur sérique pour le syndrome de Down mais reflète également des altérations placentaires pouvant conduire à des complications de la grossesse.

Jusqu'à présent le BaP était classé en catégorie 3 de PE, c'est-à-dire que les données scientifiques sont insuffisantes ou inexistantes pour le classer PE. Nous avons mis en évidence grâce à nos biomarqueurs hormonaux sur les cellules trophoblastiques JEG-3 que le BaP est un PE, en plus d'être un carcinogène. D'après nos observations, il induit un remodelage de la matrice extracellulaire et du microenvironnement lipidique des cellules placentaires, ce qui n'avait jamais été démontré jusqu'à lors. Certaines des réponses que nous avons détectées sont différentes de celles décrites dans la littérature sur d'autres types cellulaires. Afin de déterminer si ces effets sont généralisables à tous les carcinogènes ou spécifiques du BaP, il serait intéressant de comparer les effets induits par des molécules de la même famille que le BaP, tels que le chrysène ou le Dibenzo[a,h]anthracène, classés comme agents probablement carcinogènes pour l'Homme (groupe 2A selon le Centre International de Recherche sur le Cancer, le BaP étant le seul membre de cette famille classé cancérogène pour l'Homme), ou des carcinogènes reconnus, comme le formaldéhyde, sur les cellules JEG-3. Ces données nous permettraient de mieux comprendre les mécanismes cellulaires spécifiques aux cellules placentaires.

Nos travaux montrent ainsi l'importance de considérer le placenta en tant qu'organe cible de toxiques et la pertinence de l'utilisation de la lignée de trophoblastes JEG-3 pour les études de toxicité placentaire induite par des polluants. Les applications qui en découlent sont multiples et concernent les industries chimique, agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

BIBLIOGRAPHIE

Abbas I, Saint-Georges F, Billet S, Verdin A, Mulliez P, Shirali P, et al. 2009. Air pollution particulate matter (pm2.5)-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an in vitro coculture lung model. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA 23:37-46.

Abbracchio MP, Burnstock G. 1994. Purinoceptors: Are there families of p2x and p2y purinoceptors? Pharmacology & therapeutics 64:445-475.

Acuna-Castillo C, Coddou C, Bull P, Brito J, Huidobro-Toro JP. 2007. Differential role of extracellular histidines in copper, zinc, magnesium and proton modulation of the p2x7 purinergic receptor. Journal of neurochemistry 101:17-26.

Adams LA. 2011. Biomarkers of liver fibrosis. Journal of gastroenterology and hepatology 26:802-809.

Agopian AJ, Lupo PJ, Canfield MA, Langlois PH. 2013. Case-control study of maternal residential atrazine exposure and male genital malformations. American journal of medical genetics Part A 161A:977-982.

Akahori Y, Nakai M, Yamasaki K, Takatsuki M, Shimohigashi Y, Ohtaki M. 2008. Relationship between the results of in vitro receptor binding assay to human estrogen receptor alpha and in vivo uterotrophic assay: Comparative study with 65 selected chemicals. Toxicol in Vitro 22:225-231.

Akingbemi BT, Youker RT, Sottas CM, Ge RS, Katz E, Klinefelter GR, et al. 2001. Modulation of rat leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. Biology of reproduction 65:1252-1259.

Al-Saleh I, Arif J, El-Doush I, Al-Sanea N, Jabbar AA, Billedo G, et al. 2008. Carcinogen DNA adducts and the risk of colon cancer: Case-control study. Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals 13:201-216.

Alexandrova AY. 2008. Evolution of cell interactions with extracellular matrix during carcinogenesis. Biochemistry Biokhimiia 73:733-741.

Allen RH, Gottlieb M, Clute E, Pongsiri MJ, Sherman J, Obrams GI. 1997. Breast cancer and pesticides in hawaii: The need for further study. Environ Health Perspect 105 Suppl 3:679-683.

Alsat E, Mirlesse V, Fondacci C, Dodeur M, Evain-Brion D. 1991. Parathyroid hormone increases epidermal growth factor receptors in cultured human trophoblastic cells from early and term placenta. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 73:288-295.

Alves LA, Bezerra RJ, Faria RX, Ferreira LG, da Silva Frutuoso V. 2013. Physiological roles and potential therapeutic applications of the p2x7 receptor in inflammation and pain. Molecules 18:10953-10972.

An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, Lomri N, Leitman DC. 2001. Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. The Journal of biological chemistry 276:17808-17814.

Anderson WAC, Castle L, Scotter MJ, Massey RC, Springall C. 2001. A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. Food Addit Contam 18:1068-1074.

Annas A, Brittebo E, Hellman B. 2000. Evaluation of benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human endothelial cells using alkaline single cell gel electrophoresis. Mutation research 471:145-155.

ANSES. 2011. Bisphénol a : Travaux de l'anses sur les usages et effets, recommandations.

Aplin JD, Haigh T, Jones CJ, Church HJ, Vicovac L. 1999. Development of cytotrophoblast columns from explanted first-trimester human placental villi: Role of fibronectin and integrin alpha5beta1. Biology of reproduction 60:828-838.

Aplin JD, Straszewski-Chavez SL, Kalionis B, Dunk C, Morrish D, Forbes K, et al. 2006. Trophoblast differentiation: Progenitor cells, fusion and migration - a workshop report. Placenta 27:S141-S143.

Apps R, Murphy SP, Fernando R, Gardner L, Ahad T, Moffett A. 2009. Human leucocyte antigen (hla) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-hla antibodies. Immunology 127:26-39.

Arntzen KJ, Kjollesdal AM, Halgunset J, Vatten L, Austgulen R. 1998. Tnf, il-1, il-6, il-8 and soluble tnf receptors in relation to chorioamnionitis and premature labor. Journal of perinatal medicine 26:17-26.

Asha S, Girija D. 2011. Benzo[a]pyrene induced liver and kidney cancer in swiss albino mice Research in Pharmacy 1:6.

Audebert M, Riu A, Jacques C, Hillenweck A, Jamin EL, Zalko D, et al. 2010. Use of the gamma h2ax assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. Toxicol Lett 199:182-192.

Bae JS, Jang KH, Yim H, Park SC, Jin HK. 2005. Inhibitory effects of polysaccharides isolated from phellinus gilvus on benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice. World journal of gastroenterology : WJG 11:577-579.

Balabanic D, Rupnik M, Klemencic AK. 2011. Negative impact of endocrine-disrupting compounds on human reproductive health. Reproduction, fertility, and development 23:403-416.

Ballerini P, Rathbone MP, Di Iorio P, Renzetti A, Giuliani P, D'Alimonte I, et al. 1996. Rat astroglial p2z (p2x7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. Neuroreport 7:2533-2537.

Ban JB, Fan XW, Huang Q, Li BF, Chen C, Zhang HC, et al. 2014. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces injury in human umbilical vein endothelial cells. PloS one 9:e97607.

Bansal S, Leu AN, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Chowdhury AR, Anandatheerthavarada HK, et al. 2014. Mitochondrial targeting of cytochrome p450 (cyp) 1b1 and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced mitochondrial dysfunction. The Journal of biological chemistry 289:9936-9951.

Barbeau D, Persoons R, Marques M, Herve C, Laffitte-Rigaud G, Maitre A. 2014. Relevance of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene to assess exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in metallurgy workers. Ann Occup Hyg 58:579-590.

Barbier G. 2011a. Rapport n° 765 (2010-2011), l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.

Barbier G. 2011b. Rapport sur les perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution pour l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.

Barr DB, Silva MJ, Kato K, Reidy JA, Malek NA, Hurtz D, et al. 2003. Assessing human exposure to phthalates using monoesters and their oxidized metabolites as biomarkers. Environ Health Persp 111:1148-1151.

Barth K, Weinhold K, Guenther A, Young MT, Schnittler H, Kasper M. 2007. Caveolin-1 influences p2x7 receptor expression and localization in mouse lung alveolar epithelial cells. The FEBS journal 274:3021-3033.

Basu S, Leahy P, Challier JC, Minium J, Catalano P, Hauguel-de Mouzon S. 2011. Molecular phenotype of monocytes at the maternal-fetal interface. Am J Obstet Gynecol 205.

Bazin I, Ibn Hadj Hassine A, Mnif W, Gonzalez C. 2013. Yes as a tool for detecting estrogenic activity of some food additives compounds: E 104, e 122, e 124, e 132 and e 171. Journal of Ecosystem and Ecography 3:5.

Ben-Hur H, Gurevich P, Elhayany A, Avinoach I, Schneider DF, Zusman I. 2005. Transport of maternal immunoglobulins through the human placental barrier in normal pregnancy and during inflammation. Int J Mol Med 16:401-407.

Ben Amara A, Gorvel L, Baulan K, Derain-Court J, Buffat C, Verollet C, et al. 2013. Placental macrophages are impaired in chorioamnionitis, an infectious pathology of the placenta. J Immunol 191:5501-5514.

Benirschke K, Kaufmann P. 2000. Early development of the human placenta - pathology of the human placenta.

Bersinger NA, Odegard RA. 2004. Second- and third-trimester serum levels of placental proteins in preeclampsia and small-for-gestational age pregnancies. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica 83:37-45.

Bhattacharya N, Dufour JM, Vo MN, Okita J, Okita R, Kim KH. 2005. Differential effects of phthalates on the testis and the liver. Biology of reproduction 72:745-754.

Bianco F, Ceruti S, Colombo A, Fumagalli M, Ferrari D, Pizzirani C, et al. 2006. A role for p2x7 in microglial proliferation. Journal of neurochemistry 99:745-758.

Billiard SM, Hahn ME, Franks DG, Peterson RE, Bols NC, Hodson PV. 2002. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (ahrs). Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology 133:55-68.

Bischof P, Meisser A, Campana A. 2000. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion - a review. Placenta 21:S55-S60.

Blair RM, Fang H, Branham WS, Hass BS, Dial SL, Moland CL, et al. 2000. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. Toxicol Sci 54:138-153.

Bolling AK, Ovrevik J, Samuelsen JT, Holme JA, Rakkestad KE, Mathisen GH, et al. 2012. Mono-2-ethylhexylphthalate (mehp) induces tnf-alpha release and macrophage differentiation through different signalling pathways in raw264.7 cells. Toxicology letters 209:43-50.

Boonchird C, Mahapanichkul T, Cherdshewasart W. 2010. Differential binding with eralpha and erbeta of the phytoestrogen-rich plant pueraria mirifica. Brazilian journal of

medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al] 43:195-200.

Borch J, Dalgaard M, Ladefoged O. 2005. Early testicular effects in rats perinatally exposed to dehp in combination with deha - apoptosis assessment and immunohistochemical studies. Reprod Toxicol 19:517-525.

Bourdiec A, Bedard D, Rao CV, Akoum A. 2013. Human chorionic gonadotropin regulates endothelial cell responsiveness to interleukin 1 and amplifies the cytokine-mediated effect on cell proliferation, migration and the release of angiogenic factors. Am J Reprod Immunol 70:127-138.

Boverhof DR, Kwekel JC, Humes DG, Burgoon LD, Zacharewski TR. 2006. Dioxin induces an estrogen-like, estrogen receptor-dependent gene expression response in the murine uterus. Mol Pharmacol 69:1599-1606.

Brandle U, Kohler K, Wheeler-Schilling TH. 1998. Expression of the p2x7-receptor subunit in neurons of the rat retina. Brain research Molecular brain research 62:106-109.

Buchanan DL, Sato T, Peterson RE, Cooke PS. 2000. Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mouse uterus: Critical role of the aryl hydrocarbon receptor in stromal tissue. Toxicol Sci 57:302-311.

Bulmer JN, Johnson PM. 1984. Macrophage populations in the human-placenta and amniochorion. Clin Exp Immunol 57:393-403.

Burnstock G, Kennedy C. 1985. Is there a basis for distinguishing two types of p2-purinoceptor? General pharmacology 16:433-440.

Buteau-Lozano H, Velasco G, Cristofari M, Balaguer P, Perrot-Applanat M. 2008. Xenoestrogens modulate vascular endothelial growth factor secretion in breast cancer cells through an estrogen receptor-dependent mechanism. The Journal of endocrinology 196:399-412.

Byczkowski JZ, Kulkarni AP. 1990. Lipid peroxidation-coupled co-oxygenation of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol in human term placental microsomes. Placenta 11:17-26.

Calafat AM, Needham LL, Silva MJ, Lambert G. 2004. Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. Pediatrics 113:E429-E434.

Carani C, Fabbi M, Zirilli L, Sgarbi I. 2002. [estrogen resistance and aromatase deficiency in humans]. Journal de la Societe de biologie 196:245-248.

Carani C, Granata AR, Rochira V, Caffagni G, Aranda C, Antunez P, et al. 2005. Sex steroids and sexual desire in a man with a novel mutation of aromatase gene and hypogonadism. Psychoneuroendocrinology 30:413-417.

Carbone S, Ponzo OJ, Gobetto N, Samaniego YA, Reynoso R, Scacchi P, et al. 2013. Antiandrogenic effect of perinatal exposure to the endocrine disruptor di-(2-ethylhexyl) phthalate increases anxiety-like behavior in male rats during sexual maturation. Horm Behav 63:692-699.

Cartwright JE, Kenny LC, Dash PR, Crocker IP, Aplin JD, Baker PN, et al. 2002. Trophoblast invasion of spiral arteries: A novel in vitro model. Placenta 23:232-235.

Casals-Casas C, Feige JN, Desvergne B. 2008. Interference of pollutants with ppars: Endocrine disruption meets metabolism. Int J Obes (Lond) 32 Suppl 6:S53-61.

Casper RF, Quesne M, Rogers IM, Shirota T, Jolivet A, Milgrom E, et al. 1999. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: Implications for prevention of dioxin toxicity. Molecular pharmacology 56:784-790.

Chang LW, Chang YC, Ho CC, Tsai MH, Lin P. 2007. Increase of carcinogenic risk via enhancement of cyclooxygenase-2 expression and hydroxyestradiol accumulation in human lung cells as a result of interaction between bap and 17-beta estradiol. Carcinogenesis 28:1606-1612.

Chang MD, Pollard JW, Khalili H, Goyert SM, Diamond B. 1993. Mouse placental macrophages have a decreased ability to present antigen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90:462-466.

Cheek AO, Kow K, Chen J, McLachlan JA. 1999. Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: Interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin. Environ Health Perspect 107:273-278.

Chen C, Jiang X, Ren Y, Zhang Z. 2013. Arsenic trioxide co-exposure potentiates benzo(a)pyrene genotoxicity by enhancing the oxidative stress in human lung adenocarcinoma cell. Biological trace element research 156:338-349.

Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. 2013. Matrix metalloproteinases: Inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. Mediators of inflammation 2013:928315.

Chen S. 2002. Modulation of aromatase activity and expression by environmental chemicals. Front Biosci 7:D1712-D1719.

Chen T, Liu L, Xu HX, Wang WQ, Wu CT, Yao WT, et al. 2013. Significance of caveolin-1 regulators in pancreatic cancer. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP 14:4501-4507.

Chen WL, Gwo JC, Wang GS, Chen CY. 2014. Distribution of feminizing compounds in the aquatic environment and bioaccumulation in wild tilapia tissues. Environmental science and pollution research international.

Chen X, Wang J, Qin Q, Jiang Y, Yang G, Rao K, et al. 2012. Mono-2-ethylhexyl phthalate induced loss of mitochondrial membrane potential and activation of caspase3 in hepg2 cells. Environmental toxicology and pharmacology 33:421-430.

Cheshenko K, Pakdel F, Segner H, Kah O, Eggen RI. 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase cyp19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. General and comparative endocrinology 155:31-62.

Chiang HC, Tsou TC. 2009. Arsenite enhances the benzo[a]pyrene diol epoxide (bpde)-induced mutagenesis with no marked effect on repair of bpde-DNA adducts in human lung cells. Toxicol in Vitro 23:897-905.

Choy MY, Manyonda IT. 1998. The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast. Hum Reprod 13:2941-2949.

Christiansen S, Scholze M, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, Kortenkamp A, et al. 2009. Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens. Environ Health Perspect 117:1839-1846.

Chung JY, Kim JY, Kim YJ, Jung SJ, Park JE, Lee SG, et al. 2007. Cellular defense mechanisms against benzo[a]pyrene in testicular leydig cells: Implications of p53, aryl-hydrocarbon receptor, and cytochrome p450 1a1 status. Endocrinology 148:6134-6144.

Cocco P. 2002. On the rumors about the silent spring. Review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. Cadernos de saude publica 18:379-402.

Cole LA, Dai D, Butler SA, Leslie KK, Kohorn EI. 2006a. Gestational trophoblastic diseases: 1. Pathophysiology of hyperglycosylated hcg. Gynecologic oncology 102:145-150.

Cole LA, Khanlian SA, Riley JM, Butler SA. 2006b. Hyperglycosylated hcg in gestational implantation and in choriocarcinoma and testicular germ cell malignancy tumorigenesis. The Journal of reproductive medicine 51:919-929.

Cole LA. 2012. Hyperglycosylated hcg and pregnancy failures. Journal of reproductive immunology 93:119-122.

Cole LA, Butler S. 2012. Hyperglycosylated hcg, hcgbeta and hyperglycosylated hcgbeta: Interchangeable cancer promoters. Molecular and cellular endocrinology 349:232-238.

Collin A, Hardonniere K, Chevanne M, Vuillemin J, Podechard N, Burel A, et al. 2014. Cooperative interaction of benzo[a]pyrene and ethanol on plasma membrane remodeling is responsible for enhanced oxidative stress and cell death in primary rat hepatocytes. Free radical biology & medicine 72:11-22.

Cooper DW, Hill JA, Chesley LC, Bryans CI. 1988. Genetic-control of susceptibility to eclampsia and miscarriage. Brit J Obstet Gynaec 95:644-653.

Council. 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Evaluation of sources and effects. In: Polycyclic aromatic hydrocarbons: Evaluation of sources and effects. Washington (DC).

Cuff CA, Kothapalli D, Azonobi I, Chun S, Zhang Y, Belkin R, et al. 2001. The adhesion receptor cd44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. The Journal of clinical investigation 108:1031-1040.

Cvoro A, Paruthiyil S, Jones JO, Tzagarakis-Foster C, Clegg NJ, Tatomer D, et al. 2007. Selective activation of estrogen receptor-beta transcriptional pathways by an herbal extract. Endocrinology 148:538-547.

Daniel JW, Bratt H. 1974. The absorption, metabolism and tissue distribution of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. Toxicology 2:51-65.

de Jong LAA, Uges DRA, Franke JP, Bischoff R. 2005. Receptor-ligand binding assays: Technologies and applications. J Chromatogr B 829:1-25.

Desmonts G, Couvreur J. 1986. Congenital toxoplasmosis - a prospective-study of the outcome of pregnancy in 542 women with toxoplasmosis acquired during pregnancy. Sem Hop Paris 62:1418-1422.

Devito MJ, Thomas T, Martin E, Umbreit TH, Gallo MA. 1992. Antiestrogenic action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin - tissue-specific regulation of estrogen-receptor in cd1 mice. Toxicol Appl Pharm 113:284-292.

Dhasmana A, Sajid Jamal QM, Mir SS, Bhatt ML, Rahman Q, Gupta R, et al. 2014. Titanium dioxide nanoparticles as guardian against environmental carcinogen benzo[alpha]pyrene. PloS one 9:e107068.

Dhooge W, Arijs K, D'Haese I, Stuyvaert S, Versonnen B, Janssen C, et al. 2006. Experimental parameters affecting sensitivity and specificity of a yeast assay for estrogenic compounds: Results of an interlaboratory validation exercise. Anal Bioanal Chem 386:1419-1428.

Diaz-Hernandez M, Diez-Zaera M, Sanchez-Nogueiro J, Gomez-Villafuertes R, Canals JM, Alberch J, et al. 2009. Altered p2x7-receptor level and function in mouse models of huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 23:1893-1906.

Diplas AI, Lambertini L, Lee MJ, Sperling R, Lee YL, Wetmur J, et al. 2009. Differential expression of imprinted genes in normal and iugr human placentas. Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society 4:235-240.

Doss BJ, Greene MF, Hill J, Heffner LJ, Bieber FR, Genest DR. 1995. Massive chronic intervillositis associated with recurrent abortions. Human pathology 26:1245-1251.

Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, et al. 2008. Cd44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 14:6751-6760.

Dubyak GR. 2012. P2x7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. Cellular microbiology 14:1697-1706.

Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. 1999. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counselling. Lancet 353:1829-1833.

Dutot M, Liang H, Martin C, Rousseau D, Grynberg A, Warnet JM, et al. 2009. Per os administered refined olive oil and marine pufa-rich oils reach the cornea: Possible role on oxidative stress through caveolin-1 modulation. Nutrition & metabolism 6:48.

Dutot M, de la Tourrette V, Fagon R, Rat P. 2011. New approach to modulate retinal cellular toxic effects of high glucose using marine epa and dha. Nutrition & metabolism 8:39.

Edmunds KM, Holloway AC, Crankshaw DJ, Agarwal SK, Foster WG. 2005. The effects of dietary phytoestrogens on aromatase activity in human endometrial stromal cells. Reproduction, nutrition, development 45:709-720.

Einaudi L, Courbiere B, Tassistro V, Prevot C, Sari-Minodier I, Orsiere T, et al. 2014. In vivo exposure to benzo(a)pyrene induces significant DNA damage in mouse oocytes and cumulus cells. Hum Reprod 29:548-554.

el-Moatassim C, Dubyak GR. 1992. A novel pathway for the activation of phospholipase d by p2z purinergic receptors in bac1.2f5 macrophages. J Biol Chem 267:23664-23673.

Erb L, Lustig KD, Ahmed AH, Gonzalez FA, Weisman GA. 1990. Covalent incorporation of 3'-o-(4-benzoyl)benzoyl-atp into a p2 purinoceptor in transformed mouse fibroblasts. J Biol Chem 265:7424-7431.

Erkekoglu P, Rachidi W, Yuzugullu OG, Giray B, Favier A, Ozturk M, et al. 2010. Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (dehp) and mono(2-ethylhexyl)-phthalate (mehp) on ma-10 leydig cells and protection by selenium. Toxicology and applied pharmacology 248:52-62.

Ernst J, Jann JC, Biemann R, Koch HM, Fischer B. 2014. Effects of the environmental contaminants dehp and tcdd on estradiol synthesis and aryl hydrocarbon receptor and peroxisome proliferator-activated receptor signalling in the human granulosa cell line kgn. Molecular human reproduction.

Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carrillo J, et al. 2001. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. New Engl J Med 344:867-872.

European Comission. 1996. European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife. European union report eur17459. Weybridge, United Kingdom.

European Comission. 2014a. Roadmap : Defining criteria for identifying endocrine disruptors in the context of the implementation of the plant protection product regulation and biocidal products regulation.

European Comission. 2014b. Ec.Europa.Eu/environment/chemicals/endocrine/strategy/substances_en.Htm.

Evain-Brion D. 2001. [the 2 differentiation pathways of the human trophoblast]. Gynecologie, obstetrique & fertilite 29:497-502.

Fang YX, Ying GG, Zhao JL, Chen F, Liu S, Zhang LJ, et al. 2012. Assessment of hormonal activities and genotoxicity of industrial effluents using in vitro bioassays combined with chemical analysis. Environ Toxicol Chem 31:1273-1282.

Feige JN, Gelman L, Rossi D, Zoete V, Metivier R, Tudor C, et al. 2007. The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. J Biol Chem 282:19152-19166.

Feng HC, Choy MY, Deng W, Wong HL, Lau WM, Cheung AN, et al. 2005. Establishment and characterization of a human first-trimester extravillous trophoblast cell line (tev-1). Journal of the Society for Gynecologic Investigation 12:e21-32.

Feng Q, Cui S, Yang W. 2000. [clinical significance of beta-hcg and human placental lactogen in serum of normal pregnancies and patients with pregnancy induced hypertension]. Zhonghua fu chan ke za zhi 35:648-650.

Feng YH, Wang L, Wang Q, Li X, Zeng R, Gorodeski GI. 2005. Atp stimulates grk-3 phosphorylation and beta-arrestin-2-dependent internalization of p2x7 receptor. American journal of physiology Cell physiology 288:C1342-1356.

Ferguson KK, Cantonwine DE, Rivera-Gonzalez LO, Loch-Caruso R, Mukherjee B, Anzalota Del Toro LV, et al. 2014a. Urinary phthalate metabolite associations with biomarkers of inflammation and oxidative stress across pregnancy in puerto rico. Environmental science & technology 48:7018-7025.

Ferguson KK, McElrath TF, Meeker JD. 2014b. Environmental phthalate exposure and preterm birth. JAMA pediatrics 168:61-67.

Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, et al. 2006. The p2x7 receptor: A key player in il-1 processing and release. J Immunol 176:3877-3883.

Fisher S, Genbacev O, Maidji E, Pereira L. 2000. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: Implications for transmission and pathogenesis. J Virol 74:6808-6820.

Folmar LC, Hemmer M, Denslow ND, Kroll K, Chen J, Cheek A, et al. 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. Aquat Toxicol 60:101-110.

Forster K, Preuss R, Rossbach B, Bruning T, Angerer J, Simon P. 2008. 3-hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. Occup Environ Med 65:224-229.

Fournier T, Pavan L, Tarrade A, Schoonjans K, Auwerx J, Rochette-Egly C, et al. 2002. The role of ppar-gamma/rxr-alpha heterodimers in the regulation of human trophoblast invasion. Annals of the New York Academy of Sciences 973:26-30.

Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K, Evain-Brion D. 2007. Ppars and the placenta. Placenta 28:65-76.

Fournier T, Guibourdenche J, Handschuh K, Tsatsaris V, Rauwel B, Davrinche C, et al. 2011. Ppargamma and human trophoblast differentiation. Journal of reproductive immunology 90:41-49.

Frank HG, Genbacev O, Blaschitz A, Chen CP, Clarson L, Evain-Brion D, et al. 2000. Cell culture models of human trophoblast--primary culture of trophoblast--a workshop report. Placenta 21 Suppl A:S120-122.

Friden BE, Makiya R, Nilsson BM, Holm S, Stigbrand TI. 1994. The human placental immunoglobulin g receptor and immunoglobulin g transport. Am J Obstet Gynecol 171:258-263.

Fromme H, Gruber L, Schlurnmer M, Wz G, Bohmer S, Angerer J, et al. 2007. Intake of phthalates and di(2-ethylhexyl)adipate: Results of the integrated exposure assessment survey based on duplicate diet samples and biomonitoring data. Environment international 33:1012-1020.

Fromme H, Gruber L, Seckin E, Raab U, Zimmermann S, Kiranoglu M, et al. 2011. Phthalates and their metabolites in breast milk - results from the bavarian monitoring of breast milk (bambi). Environment international 37:715-722.

Fu W, McCormick T, Qi X, Luo L, Zhou L, Li X, et al. 2009. Activation of p2x(7)-mediated apoptosis inhibits dmba/tpa-induced formation of skin papillomas and cancer in mice. BMC cancer 9:114.

Galvan N, Teske DE, Zhou G, Moorthy B, MacWilliams PS, Czuprynski CJ, et al. 2005. Induction of cyp1a1 and cyp1b1 in liver and lung by benzo(a)pyrene and 7,12-d imethylbenz(a)anthracene do not affect distribution of polycyclic hydrocarbons to target tissue: Role of ahr and cyp1b1 in bone marrow cytotoxicity. Toxicology and applied pharmacology 202:244-257.

Gao M, Li Y, Sun Y, Long J, Kong Y, Yang S, et al. 2011. A common carcinogen benzo[a]pyrene causes p53 overexpression in mouse cervix via DNA damage. Mutation research 724:69-75.

Garcia-Marcos M, Perez-Andres E, Tandel S, Fontanils U, Kumps A, Kabre E, et al. 2006. Coupling of two pools of p2x7 receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland. Journal of lipid research 47:705-714.

Garcia AG, Fonseca EF, Marques RL, Lobato YY. 1989. Placental morphology in cytomegalovirus infection. Placenta 10:1-18.

Garry S, Nesslany F, Aliouat E, Haguenoer JM, Marzin D. 2003. Assessment of genotoxic effect of benzo[a]pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay. Mutation research 534:33-43.

Gaunt G, Ramin K. 2001. Immunological tolerance of the human fetus. Am J Perinat 18:299-312.

Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. 2011. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. The FEBS journal 278:16-27.

Gonzalez FA, Ahmed AH, Lustig KD, Erb L, Weisman GA. 1989. Permeabilization of transformed mouse fibroblasts by 3'-o-(4-benzoyl)benzoyl adenosine 5'-triphosphate and the desensitization of the process. Journal of cellular physiology 139:109-115.

Gorria M, Tekpli X, Sergent O, Huc L, Gaboriau F, Rissel M, et al. 2006. Membrane fluidity changes are associated with benzo[a]pyrene-induced apoptosis in f258 cells: Protection by exogenous cholesterol. Annals of the New York Academy of Sciences 1090:108-112.

Goyal PK, Verma P, Sharma P, Parmar J, Agarwal A. 2010. Evaluation of anti-cancer and anti-oxidative potential of syzygium cumini against benzo[a]pyrene (bap) induced gastric carcinogenesis in mice. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP 11:753-758.

Gracia T, Hilscherova K, Jones PD, Newsted JL, Zhang X, Hecker M, et al. 2006. The h295r system for evaluation of endocrine-disrupting effects. Ecotoxicology and environmental safety 65:293-305.

Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, Macdougall JR, Kerbel RS, Khoo N, et al. 1993. Establishment and characterization of 1st trimester human trophoblast cells with extended life-span. Experimental cell research 206:204-211.

Green R, Hauser R, Calafat AM, Weuve J, Schettler T, Ringer S, et al. 2005. Use of di(2-ethylhexyl) phthalate-containing medical products and urinary levels of mono(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care unit infants. Environ Health Persp 113:1222-1225.

Green S, Kumar V, Krust A, Walter P, Chambon P. 1986. Structural and functional domains of the estrogen receptor. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology 51 Pt 2:751-758.

Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, et al. 1995. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cdna: Expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. Gene expression 4:281-299.

Gremlich S, Damnon F, Reymondin D, Braissant O, Schittny JC, Baud D, et al. 2014. The long non-coding rna neat1 is increased in iugr placentas, leading to potential new hypotheses of iugr origin/development. Placenta 35:44-49.

Griffith OL, Melck A, Jones SJ, Wiseman SM. 2006. Meta-analysis and meta-review of thyroid cancer gene expression profiling studies identifies important diagnostic biomarkers. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 24:5043-5051.

Grunnet M, Mau-Sorensen M, Brunner N. 2013. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (timp-1) as a biomarker in gastric cancer: A review. Scandinavian journal of gastroenterology 48:899-905.

Gu BJ, Baird PN, Vessey KA, Skarratt KK, Fletcher EL, Fuller SJ, et al. 2013. A rare functional haplotype of the p2rx4 and p2rx7 genes leads to loss of innate phagocytosis and

confers increased risk of age-related macular degeneration. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 27:1479-1487.

Guo Y, Zhou B. 2013. Thyroid endocrine system disruption by pentachlorophenol: An in vitro and in vivo assay. Aquat Toxicol 142-143:138-145.

Guo YY, Huo X, Wu KS, Liu JX, Zhang YL, Xu XJ. 2012. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in umbilical cord blood of human neonates from guiyu, china. Sci Total Environ 427:35-40.

Han Z, Zhang Y, Xu Y, Ji J, Xu W, Zhao Y, et al. 2014. Cell cycle changes mediated by the p53/mir-34c axis are involved in the malignant transformation of human bronchial epithelial cells by benzo[a]pyrene. Toxicology letters 225:275-284.

Harris LK, Baker PN, Brenchley PE, Aplin JD. 2008. Trophoblast-derived heparanase is not required for invasion. Placenta 29:7.

Hecker M, Newsted JL, Murphy MB, Higley EB, Jones PD, Wu R, et al. 2006. Human adrenocarcinoma (h295r) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production. Toxicol Appl Pharm 217:114-124.

Hecker M, Giesy JP. 2008. Novel trends in endocrine disruptor testing: The h295r steroidogenesis assay for identification of inducers and inhibitors of hormone production. Anal Bioanal Chem 390:287-291.

Helbo V, Vandenbroeck M, Maghuinrogister G. 1994. Development of a radioreceptor assay for beta(2) adrenergic agonists. Arch Lebensmittelhyg 45:57-61.

Henderson BE, Benton B, Cosgrove M, Baptista J, Aldrich J, Townsend D, et al. 1976. Urogenital tract abnormalities in sons of women treated with diethylstilbestrol. Pediatrics 58:505-507.

Houser BL. 2012. Decidual macrophages and their roles at the maternal-fetal interface. The Yale journal of biology and medicine 85:105-118.

Hu WY, Shi GB, Hu DP, Nelles JL, Prins GS. 2012. Actions of estrogens and endocrine disrupting chemicals on human prostate stem/progenitor cells and prostate cancer risk. Mol Cell Endocrinol 354:63-73.

Huang Y, Li J, Garcia JM, Lin H, Wang Y, Yan P, et al. 2014. Phthalate levels in cord blood are associated with preterm delivery and fetal growth parameters in chinese women. PloS one 9:e87430.

Huang YJ, Li JN, Garcia JM, Lin H, Wang YZ, Yan P, et al. 2014. Phthalate levels in cord blood are associated with preterm delivery and fetal growth parameters in chinese women. PloS one 9.

Huc L, Gilot D, Gardyn C, Rissel M, Dimanche-Boitrel MT, Guillouzo A, et al. 2003. Apoptotic mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in liver epithelial cells: Role of p53 and phi changes. Annals of the New York Academy of Sciences 1010:167-170.

Humphreys BD, Dubyak GR. 1996. Induction of the p2z/p2x7 nucleotide receptor and associated phospholipase d activity by lipopolysaccharide and ifn-gamma in the human thp-1 monocytic cell line. J Immunol 157:5627-5637.

Hurst CH, Waxman DJ. 2003. Activation of pparalpha and ppargamma by environmental phthalate monoesters. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 74:297-308.

Iglesias-Platas I, Martin-Trujillo A, Petazzi P, Guillaumet-Adkins A, Esteller M, Monk D. 2014. Altered expression of the imprinted transcription factor plagl1 deregulates a network of genes in the human iugr placenta. Human molecular genetics.

INRS. 2004. Le point des connaissances sur les phtalates.

INRS. 2010. Fiche demeter.

INRS. 2014. Biotox - substance - benzo[a]pyrène, nature du dosage 3-hydroxybenzo[a]pyrène urinaire.

INSERM. 2008. Expertise collective inserm : Cancer et environnement.

INSERM. 2011. Expertise collective : Reproduction et environnement.

Inyang F, Ramesh A, Kopsombut P, Niaz MS, Hood DB, Nyanda AM, et al. 2003. Disruption of testicular steroidogenesis and epididymal function by inhaled benzo(a)pyrene. Reprod Toxicol 17:527-537.

Irving JA, Lysiak JJ, Graham CH, Hearn S, Han VK, Lala PK. 1995. Characteristics of trophoblast cells migrating from first trimester chorionic villus explants and propagated in culture. Placenta 16:413-433.

Issemann I, Green S. 1990. Activation of a member of the steroid-hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature 347:645-650.

Jeffy BD, Chen EJ, Gudas JM, Romagnolo DF. 2000. Disruption of cell cycle kinetics by benzo[a]pyrene: Inverse expression patterns of brca-1 and p53 in mcf-7 cells arrested in s and g2. Neoplasia 2:460-470.

Jeng HA, Yordt D, Davis S, Swanson JR. 2013. Assessment of alteration of reproductive system in vivo induced by subchronic exposure to benzo(a)pyrene via oral administration. Environmental toxicology.

Ji K, Xing C, Jiang F, Wang X, Guo H, Nan J, et al. 2013. Benzo[a]pyrene induces oxidative stress and endothelial progenitor cell dysfunction via the activation of the nf-kappab pathway. International journal of molecular medicine 31:922-930.

Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A. 2000. Brilliant blue g selectively blocks atp-gated rat p2x(7) receptors. Molecular pharmacology 58:82-88.

Jiang Y, Zhou X, Chen X, Yang G, Wang Q, Rao K, et al. 2011. Benzo(a)pyrene-induced mitochondrial dysfunction and cell death in p53-null hep3b cells. Mutation research 726:75-83.

Jones ME, Boon WC, McInnes K, Maffei L, Carani C, Simpson ER. 2007. Recognizing rare disorders: Aromatase deficiency. Nature clinical practice Endocrinology & metabolism 3:414-421.

Juberg DR, Gehen SC, Coady KK, LeBaron MJ, Kramer VJ, Lu H, et al. 2013. Chlorpyrifos: Weight of evidence evaluation of potential interaction with the estrogen, androgen, or thyroid pathways. Regulatory toxicology and pharmacology : RTP 66:249-263.

Kahlenberg JM, Dubyak GR. 2004. Mechanisms of caspase-1 activation by p2x7 receptor-mediated k+ release. American journal of physiology Cell physiology 286:C1100-1108.

Kalfa N, Paris F, Soyer-Gobillard MO, Daures JP, Sultan C. 2011. Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: A multigenerational national cohort study. Fertil Steril 95:2574-2577.

Kalousek DK, Dill FJ. 1983. Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. Science 221:665-667.

Karttunen V, Myllynen P, Prochazka G, Pelkonen O, Segerback D, Vahakangas K. 2010. Placental transfer and DNA binding of benzo(a)pyrene in human placental perfusion. Toxicol Lett 197:75-81.

Kato K, Silva MJ, Reidy JA, Hurtz D, Malek NA, Needham LL, et al. 2004. Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate. Environ Health Persp 112:327-330.

Khoo NKS, Zhang YC, Bechberger JF, Bond SL, Hum K, Lala PK. 1998. Sv40 tag transformation of the normal invasive trophoblast results in a premalignant phenotype. Ii. Changes in gap junctional intercellular communication. Int J Cancer 77:440-448.

Kim HS, Kwack SJ, Lee BM. 2000. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo[a]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[a]pyrene. Chemico-biological interactions 127:139-150.

Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A. 2001. Proteomic and functional evidence for a p2x7 receptor signalling complex. The EMBO journal 20:6347-6358.

King A, Burrows TD, Hiby SE, Bowen JM, Joseph S, Verma S, et al. 2000. Surface expression of hla-c antigen by human extravillous trophoblast. Placenta 21:376-387.

Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, 3rd. 1986. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. Endocrinology 118:1567-1582.

Klip H, Verloop J, van Gool JD, Koster META, Burger CW, van Leeuwen FE, et al. 2002. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: A cohort study. Lancet 359:1102-1107.

Knerr S, Schrenk D. 2006. Carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in experimental models. Mol Nutr Food Res 50:897-907.

Knower KC, To SQ, Leung YK, Ho SM, Clyne CD. 2014. Endocrine disruption of the epigenome: A breast cancer link. Endocrine-related cancer 21:T33-55.

Koch HM, Calafat AM. 2009. Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. Philos T R Soc B 364:2063-2078.

Kohler PF, Farr RS. 1966. Elevation of cord over maternal igg immunoglobulin: Evidence for an active placental igg transport. Nature 210:1070-1071.

Kohut KG, Anthony MN, Salafia CM. 1997. Decidual and placental histologic findings in patients experiencing spontaneous abortions in relation to pregnancy order. Am J Reprod Immunol 37:257-261.

Kookana RS, Shareef A, Fernandes MB, Hoare S, Gaylard S, Kumar A. 2013. Bioconcentration of triclosan and methyl-triclosan in marine mussels (mytilus galloprovincialis) under laboratory conditions and in metropolitan waters of gulf st vincent, south australia. Marine pollution bulletin 74:66-72.

Kortenkamp A. 2007. Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. Environ Health Perspect 115 Suppl 1:98-105.

Kuo LJ, Yang LX. 2008. Gamma-h2ax - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In Vivo 22:305-309.

La Sala G, Farini D, De Felici M. 2010. Estrogenic in vitro assay on mouse embryonic leydig cells. The International journal of developmental biology 54:717-722.

Labarrere C, Althabe O. 1985. Chronic villitis of unknown etiology and maternal arterial lesions in preeclamptic pregnancies. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology 20:1-11.

Lambrecht G, Braun K, Damer M, Ganso M, Hildebrandt C, Ullmann H, et al. 2002. Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as p2 receptor antagonists. Current pharmaceutical design 8:2371-2399.

Lambrot R, Muczynski V, Lecureuil C, Angenard G, Coffigny H, Pairault C, et al. 2009. Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. Environ Health Persp 117:32-37.

Lans MC, Spiertz C, Brouwer A, Koeman JH. 1994. Different competition of thyroxine binding to transthyretin and thyroxine-binding globulin by hydroxy-pcbs, pcdds and pcdfs. European journal of pharmacology 270:129-136.

Larue L, Bellacosa A. 2005. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: Role of phosphatidylinositol 3' kinase/akt pathways. Oncogene 24:7443-7454.

Lathi RB, Liebert CA, Brookfield KF, Taylor JA, Vom Saal FS, Fujimoto VY, et al. 2014. Conjugated bisphenol a in maternal serum in relation to miscarriage risk. Fertil Steril 102:123-128.

Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, Ruggieri F, et al. 2003. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. Environ Health Persp 111:1783-1785.

Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D. 1992. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. Embo Journal 11:1003-1013.

Le Vee M, Kolasa E, Jouan E, Collet N, Fardel O. 2014. Differentiation of human placental bewo cells by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. Chemico-biological interactions 210:1-11.

Leiser R, Kaufmann P. 1994. Placental structure - in a comparative aspect. Exp Clin Endocrinol 102:122-134.

Li D, Wang LE, Chang P, El-Naggar AK, Sturgis EM, Wei Q. 2007. In vitro benzo[a]pyrene diol epoxide-induced DNA adducts and risk of squamous cell carcinoma of head and neck. Cancer research 67:5628-5634.

Liland NS, Simonsen AC, Duelund L, Torstensen BE, Berntssen MH, Mouritsen OG. 2014. Polyaromatic hydrocarbons do not disturb liquid-liquid phase coexistence, but increase the fluidity of model membranes. Chemistry and physics of lipids 184C:18-24.

Lin L, Zheng LX, Gu YP, Wang JY, Zhang YH, Song WM. 2008. [levels of environmental endocrine disruptors in umbilical cord blood and maternal blood of low-birth-weight infants]. Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine] 42:177-180.

Lister MF, Sharkey J, Sawatzky DA, Hodgkiss JP, Davidson DJ, Rossi AG, et al. 2007. The role of the purinergic p2x7 receptor in inflammation. J Inflamm (Lond) 4:5.

Liu J, Wang R, Huang B, Lin C, Wang Y, Pan X. 2011. Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from dianchi lake, china. Environ Pollut 159:2815-2822.

Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, et al. 2002. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin d1 gene expression. The Journal of biological chemistry 277:24353-24360.

Logan SK, Fisher SJ, Damsky CH. 1992. Human placental cells transformed with temperature-sensitive simian virus-40 are immortalized and mimic the phenotype of invasive cytotrophoblasts at both permissive and nonpermissive temperatures. Cancer research 52:6001-6009.

Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, et al. 2003. Nongenomic steroid action: Controversies, questions, and answers. Physiological reviews 83:965-1016.

Ma DH, Chen LJ, Zhu XB, Li FF, Liu C, Liu R. 2014. Assessment of combined antiandrogenic effects of binary parabens mixtures in a yeast-based reporter assay. Environ Sci Pollut R 21:6482-6494.

Mackenzie AB, Young MT, Adinolfi E, Surprenant A. 2005. Pseudoapoptosis induced by brief activation of atp-gated p2x7 receptors. J Biol Chem 280:33968-33976.

Maloney EK, Waxman DJ. 1999. Trans-activation of pparalpha and ppargamma by structurally diverse environmental chemicals. Toxicology and applied pharmacology 161:209-218.

Manyonda IT, Whitley GS, Cartwright JE. 2001. Trophoblast cell lines: A response to the workshop report by king et al. Placenta 22:262-263.

McLarnon JG, Ryu JK, Walker DG, Choi HB. 2006. Upregulated expression of purinergic p2x(7) receptor in alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. Journal of neuropathology and experimental neurology 65:1090-1097.

Menzies J, Paul A, Kennedy C. 2003. P2x7 subunit-like immunoreactivity in the nucleus of visceral smooth muscle cells of the guinea pig. Autonomic neuroscience : basic & clinical 106:103-109.

Merriman GH, Ma L, Shum P, McGarry D, Volz F, Sabol JS, et al. 2005. Synthesis and sar of novel 4,5-diarylimidazolines as potent p2x7 receptor antagonists. Bioorganic & medicinal chemistry letters 15:435-438.

Merviel P, Muller F, Guibourdenche J, Berkane N, Gaudet R, Breart G, et al. 2001. Correlations between serum assays of human chorionic gonadotrophin (hcg) and human placental lactogen (hpl) and pre-eclampsia or intrauterine growth restriction (iugr) among nulliparas younger than 38 years. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology 95:59-67.

Miller EC, Miller JA. 1981. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. Cancer-Am Cancer Soc 47:2327-2345.

Miller JA. 1970. Carcinogenesis by chemicals - an overview. Cancer research 30:559-&.

Miller RK, Genbacev O, Turner MA, Aplin JD, Caniggia I, Huppertz B. 2005. Human placental explants in culture: Approaches and assessments. Placenta 26:439-448.

Moore BP, Cohen GM. 1978. Metabolism of benzo(a)pyrene and its major metabolites to ethyl acetate-soluble and water-soluble metabolites by cultured rodent trachea. Cancer research 38:3066-3075.

Mortaz E, Adcock IM, Shafei H, Masjedi MR, Folkerts G. 2012. Role of p2x7 receptors in release of il-1beta: A possible mediator of pulmonary inflammation. Tanaffos 11:6-11.

Mose T, Knudsen LE, Hedegaard M, Mortensen GK. 2007a. Transplacental transfer of monomethyl phthalate and mono(2-ethylhexyl) phthalate in a human placenta perfusion system. Int J Toxicol 26:221-229.

Mose T, Mortensen GK, Hedegaard M, Knudsen LE. 2007b. Phthalate monoesters in perfusate from a dual placenta perfusion system, the placenta tissue and umbilical cord blood. Reprod Toxicol 23:83-91.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. 1996. Er beta: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS letters 392:49-53.

Mues B, Langer D, Zwadlo G, Sorg C. 1989. Phenotypic characterization of macrophages in human term placenta. Immunology 67:303-307.

Murdoch S, Djuric U, Mazhar B, Seoud M, Khan R, Kuick R, et al. 2006. Mutations in nalp7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. Nat Genet 38:300-302.

Murgia M, Hanau S, Pizzo P, Rippa M, Di Virgilio F. 1993. Oxidized atp. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic p2z receptor. J Biol Chem 268:8199-8203.

Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, et al. 2002. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: Implications for reversibility of liver fibrosis. The Journal of biological chemistry 277:11069-11076.

Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. 1997. Relative binding affinity-serum modified access (rba-sma) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol a and octylphenol. Environ Health Perspect 105:70-76.

Nagle RB. 2004. Role of the extracellular matrix in prostate carcinogenesis. Journal of cellular biochemistry 91:36-40.

Naidu M, Nama V, Karoshi M, Kakumani V, Worth R. 2007. Umbilical cord rupture: A case report and review of literature. International journal of fertility and women's medicine 52:107-110.

Ndebele K, Graham B, Tchounwou PB. 2010. Estrogenic activity of coumestrol, ddt, and tcdd in human cervical cancer cells. Int J Env Res Pub He 7:2045-2056.

Nehemiah JL, Schnitzer JA, Schulman H, Novikoff AB. 1981. Human chorionic trophoblasts, decidual cells, and macrophages: A histochemical and electron microscopic study. Am J Obstet Gynecol 140:261-268.

Nemere I, Pietras RJ, Blackmore PF. 2003. Membrane receptors for steroid hormones: Signal transduction and physiological significance. Journal of cellular biochemistry 88:438-445.

Newbern D, Freemark M. 2011. Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity 18:409-416.

Noble JM, Thomas TH, Ford GA. 1999. Effect of age on plasma membrane asymmetry and membrane fluidity in human leukocytes and platelets. The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences 54:M601-606.

Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP. 2004. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. Nature reviews Drug discovery 3:27-41.

Notomi S, Hisatomi T, Murakami Y, Terasaki H, Sonoda S, Asato R, et al. 2013. Dynamic increase in extracellular atp accelerates photoreceptor cell apoptosis via ligation of p2rx7 in subretinal hemorrhage. PloS one 8:e53338.

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. Endocr Rev 22:289-318.

Ohno K, Fukushima T, Santa T, Waizumi N, Tokuyama H, Maeda M, et al. 2002. Estrogen receptor binding assay method for endocrine disruptors using fluorescence polarization. Anal Chem 74:4391-4396.

Paguio A, Stecha P, Wood KV, Fan F. 2010. Improved dual-luciferase reporter assays for nuclear receptors. Current chemical genomics 4:43-49.

Palmer JR, Herbst AL, Noller KL, Boggs DA, Troisi R, Titus-Ernstoff L, et al. 2009. Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: A cohort study. Environ Health-Glob 8.

Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Hilton HG, Guethlein LA. 2012. Review: Immunogenetics of human placentation. Placenta 33 Suppl:S71-80.

Parry DA, Logan CV, Hayward BE, Shires M, Landolsi H, Diggle C, et al. 2011. Mutations causing familial biparental hydatidiform mole implicate c6orf221 as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocyte. Am J Hum Genet 89:451-458.

Parvathenani LK, Tertyshnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R. 2003. P2x7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of alzheimer's disease. The Journal of biological chemistry 278:13309-13317.

Patel MR, Scheffler BE, Wang L, Willett KL. 2006. Effects of benzo(a)pyrene exposure on killifish (fundulus heteroclitus) aromatase activities and mrna. Aquat Toxicol 77:267-278.

Pattillo RA, Gey GO. 1968. The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. Cancer research 28:1231-1236.

Pattillo RA, Ruckert A, Hussa R, Bernstei.R, Delfs E. 1971. Jar cell line - continuous human multihormone production and controls. In Vitro Cell Dev B 6:398-&.

Pavan L, Tarrade A, Hermouet A, Delouis C, Titeux M, Vidaud M, et al. 2003. Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of ppar gamma in cell invasion process. Carcinogenesis 24:1325-1336.

Payan JP, Lafontaine M, Simon P, Marquet F, Champmartin-Gendre C, Beydon D, et al. 2009. 3-hydroxybenzo(a)pyrene as a biomarker of dermal exposure to benzo(a)pyrene. Arch Toxicol 83:873-883.

Pelegrin P, Surprenant A. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the atp-gated p2x7 receptor. The EMBO journal 25:5071-5082.

Pelegrin P. 2011. Many ways to dilate the p2x7 receptor pore. British journal of pharmacology 163:908-911.

Peng W, Cotrina ML, Han X, Yu H, Bekar L, Blum L, et al. 2009. Systemic administration of an antagonist of the atp-sensitive receptor p2x7 improves recovery after spinal cord injury. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:12489-12493.

Pereira L, Maidji E, McDonagh S, Genbacev O, Fisher S. 2003. Human cytomegalovirus transmission from the uterus to the placenta correlates with the presence of pathogenic bacteria and maternal immunity. J Virol 77:13301-13314.

Pesatori AC, Consonni D, Rubagotti M, Grillo P, Bertazzi PA. 2009. Cancer incidence in the population exposed to dioxin after the "seveso accident": Twenty years of follow-up. Environ Health-Glob 8.

Phillips DH. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. Mutation research 443:139-147.

Pons JC, Papiernik E, Billon A, Hessabi M, Duyme M. 2005. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero. Prenatal Diag 25:418-419.

Popek EJ. 1992. Granulomatous villitis due to toxoplasma gondii. Pediatric pathology / affiliated with the International Paediatric Pathology Association 12:281-288.

Quignot N, Desmots S, Barouki R, Lemazurier E. 2012. A comparison of two human cell lines and two rat gonadal cell primary cultures as in vitro screening tools for aromatase modulation. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA 26:107-118.

Rakkestad KE, Holme JA, Paulsen RE, Schwarze PE, Becher R. 2010. Mono(2-ethylhexyl) phthalate induces both pro- and anti-inflammatory responses in rat alveolar macrophages through crosstalk between p38, the lipoxygenase pathway and pparalpha. Inhalation toxicology 22:140-150.

Ramireza T, Buechseb A, Dammanna M, Melching-Kollmußc S, Woitkowiaka C, van Ravenzwaay B. 2014. Effect of estrogenic binary mixtures in the yeast estrogen screen Regulatory Toxicology and Pharmacology 70:11.

Rampanelli E, Rouschop KM, Claessen N, Teske GJ, Pals ST, Leemans JC, et al. 2014. Opposite role of cd44-standard and cd44-variant-3 in tubular injury and development of renal fibrosis during chronic obstructive nephropathy. Kidney international 86:558-569.

Ramya D, Siddikuzzaman, Manjamalai A, Berlin Grace VM. 2012. Chemoprotective effect of all-trans retinoic acid (atra) on oxidative stress and lung metastasis induced by benzo(a)pyrene. Immunopharmacology and immunotoxicology 34:317-325.

Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A. 1997. The permeabilizing atp receptor, p2x7. Cloning and expression of a human cdna. J Biol Chem 272:5482-5486.

Reese C, Lee R, Bonner M, Perry B, Heywood J, Silver RM, et al. 2014. Fibrocytes in the fibrotic lung: Altered phenotype detected by flow cytometry. Frontiers in pharmacology 5:141.

Remy M, Thaler S, Schumann RG, May CA, Fiedorowicz M, Schuettauf F, et al. 2008. An in vivo evaluation of brilliant blue g in animals and humans. The British journal of ophthalmology 92:1142-1147.

Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N, Mornagui B. 2014. Bisphenol a and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. Environment international 64:83-90.

Rickenbacher U, McKinney JD, Oatley SJ, Blake CC. 1986. Structurally specific binding of halogenated biphenyls to thyroxine transport protein. Journal of medicinal chemistry 29:641-648.

Ries C. 2014. Cytokine functions of timp-1. Cellular and molecular life sciences : CMLS 71:659-672.

Rizza P, Barone I, Zito D, Giordano F, Lanzino M, De Amicis F, et al. 2014. Estrogen receptor beta as a novel target of androgen receptor action in breast cancer cell lines. Breast cancer research : BCR 16:R21.

Robbins JR, Zeldovich VB, Poukchanski A, Boothroyd JC, Bakardjiev AI. 2012. Tissue barriers of the human placenta to infection with toxoplasma gondii. Infect Immun 80:418-428.

Roberts VH, Greenwood SL, Elliott AC, Sibley CP, Waters LH. 2006. Purinergic receptors in human placenta: Evidence for functionally active p2x4, p2x7, p2y2, and p2y6. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology 290:R1374-1386.

Rodas-Ortiz JP, Ceja-Moreno V, Chan-Cocom ME, Gold-Bouchot G. 2008. Vitellogenin induction and increased plasma 17beta-estradiol concentrations in male nile tilapia, oreochromis niloticus, exposed to organochlorine pollutants and polycyclic aromatics hydrocarbons. Bulletin of environmental contamination and toxicology 81:543-547.

Rogers JM, Denison MS. 2002. Analysis of the antiestrogenic activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human ovarian carcinoma bg-1 cells. Mol Pharmacol 61:1393-1403.

Romero R, Mazor M, Tartakovsky B. 1991. Systemic administration of interleukin-1 induces preterm parturition in mice. American journal of obstetrics and gynecology 165:969-971.

Rossant J, Cross JC. 2001. Placental development: Lessons from mouse mutants. Nature reviews Genetics 2:538-548.

Rossner P, Milcova A, Libalova H, Novakova Z, Topinka J, Balascak I, et al. 2009. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part ii. Oxidative damage. Mutat Res-Fund Mol M 669:20-26.

Rossner P, Jr., Rossnerova A, Beskid O, Tabashidze N, Libalova H, Uhlirova K, et al. 2014. Nonhomologous DNA end joining and chromosome aberrations in human embryonic lung fibroblasts treated with environmental pollutants. Mutation research Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis 763-764C:28-38.

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell 68:673-682.

Ryu JY, Whang J, Park H, Im JY, Kim J, Ahn MY, et al. 2007. Di(2-ethylhexyl) phthalate induces apoptosis through peroxisome proliferators-activated receptor-gamma and erk 1/2 activation in testis of sprague-dawley rats. J Toxicol Env Heal A 70:1296-1303.

Sadowsky DW, Adams KM, Gravett MG, Witkin SS, Novy MJ. 2006. Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model. American journal of obstetrics and gynecology 195:1578-1589.

Sak K, Webb TE. 2002. A retrospective of recombinant p2y receptor subtypes and their pharmacology. Archives of biochemistry and biophysics 397:131-136.

Salafia CM, Pezzullo JC, Lopez-Zeno JA, Simmens S, Minior VK, Vintzileos AM. 1995. Placental pathologic features of preterm preeclampsia. American journal of obstetrics and gynecology 173:1097-1105.

Sanyal MK, Li YL. 2007. Differential metabolism of benzo[alpha]pyrene in vitro by human placental tissues exposed to active maternal cigarette smoke. Birth defects research Part B, Developmental and reproductive toxicology 80:49-56.

Sanz JM, Chiozzi P, Ferrari D, Colaianna M, Idzko M, Falzoni S, et al. 2009. Activation of microglia by amyloid {beta} requires p2x7 receptor expression. J Immunol 182:4378-4385.

Sanz JM, Chiozzi P, Colaianna M, Zotti M, Ferrari D, Trabace L, et al. 2012. Nimodipine inhibits il-1beta release stimulated by amyloid beta from microglia. British journal of pharmacology 167:1702-1711.

Savouret JF, Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E, Casper RF. 2001. 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. The Journal of biological chemistry 276:3054-3059.

Schafer TE, Lapp CA, Hanes CM, Lewis JB, Wataha JC, Schuster GS. 1999. Estrogenicity of bisphenol a and bisphenol a dimethacrylate in vitro. Journal of biomedical materials research 45:192-197.

Schlezinger JJ, Howard GJ, Hurst CH, Emberley JK, Waxman DJ, Webster T, et al. 2004. Environmental and endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists induce bone marrow b cell growth arrest and apoptosis: Interactions between mono(2-ethylhexyl)phthalate, 9-cis-retinoic acid, and 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin j2. J Immunol 173:3165-3177.

Schmeichel KL, Weaver VM, Bissell MJ. 1998. Structural cues from the tissue microenvironment are essential determinants of the human mammary epithelial cell phenotype. Journal of mammary gland biology and neoplasia 3:201-213.

Schnorr TM, Lawson CC, Whelan EA, Dankovic DA, Deddens JA, Piacitelli LA, et al. 2001. Spontaneous abortion, sex ratio, and paternal occupational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Environ Health Perspect 109:1127-1132.

Scippo ML, Van de Weerdt C, Willemsen P, Francois JM, Rentier-Delrue F, Muller M, et al. 2002. Detection of illegal growth promoters in biological samples using receptor binding assays. Anal Chim Acta 473:135-141.

Scippo ML, Argiris C, Van de Weerdt C, Muller M, Willemsen P, Martial J, et al. 2004a. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. Anal Bioanal Chem 378:664-669.

Scippo ML, Eppe G, De Pauw E, Maghuin-Rogister G. 2004b. Dr-calux((r)) screening of food samples: Evaluation of the quantitative approach to measure dioxin, furans and dioxin-like pcbs. Talanta 63:1193-1202.

Scippo ML, Rybertt S, Eppe G, Massart AC, De Pauw E, Maghuin-Rogister G. 2006. Dioxin analysis in feed: Cell-based assay versus mass spectrometry method. Accredit Qual Assur 11:38-43.

Scippo ML, Maghuin-Rogister G. 2007. Endocrine disruptors in food: Potential impact on human health. Ann Med Vet 151:44-54.

Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. 1992. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor cd44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. P Natl Acad Sci USA 89:12160-12164.

Sebire NJ, Foskett M, Fisher RA, Rees H, Seckl M, Newlands E. 2002. Risk of partial and complete relation hydatidiform molar pregnancy in to maternal age. Bjog-Int J Obstet Gy 109:99-102.

Sebire NJ, Seckl MJ. 2008. Gestational trophoblastic disease: Current management of hydatidiform mole. Brit Med J 337.

Shatz M, Liscovitch M. 2008. Caveolin-1: A tumor-promoting role in human cancer. International journal of radiation biology 84:177-189.

Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. 1993. Cdna cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. Biochemistry 32:5598-5604.

Siiteri PK, MacDonald PC. 1966. Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 26:751-761.

Silva MJ, Reidy A, Preau JL, Samandar E, Needham LL, Calafat AM. 2006. Measurement of eight urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment. Biomarkers 11:1-13.

Silver RM, Lohner S, Chen CL. 1993. Tumor necrosis factor-alpha mediates lps-induced abortion: Evidence from the lps-resistant murine strain c3h/hej. J Soc Gynecol Investig:213.

Simister NE. 2003. Placental transport of immunoglobulin g. Vaccine 21:3365-3369.

Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, et al. 2002. Aromatase--a brief overview. Annual review of physiology 64:93-127.

Smart ML, Gu B, Panchal RG, Wiley J, Cromer B, Williams DA, et al. 2003. P2x7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal c-terminal region. J Biol Chem 278:8853-8860.

Soto AM, Lin TM, Justicia H, Silvia RM, Sonnenschein C. 1992. An in culture bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (e-screen). Adv Mod Env 21:295-309.

Steinberg TH, Silverstein SC. 1987. Extracellular atp4- promotes cation fluxes in the j774 mouse macrophage cell line. J Biol Chem 262:3118-3122.

Stillman RJ. 1982. Inutero exposure to diethylstilbestrol - adverse-effects on the reproductive-tract and reproductive-performance in male and female offspring. Am J Obstet Gynecol 142:905-921.

Stroheker T, Cabaton N, Nourdin G, Regnier JF, Lhuguenot JC, Chagnon MC. 2005. Evaluation of anti-androgenic activity of di-(2-ethylhexyl)phthalate. Toxicology 208:115-121.

Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. 1996. The cytolytic p2z receptor for extracellular atp identified as a p2x receptor (p2x7). Science 272:735-738.

Swan SH. 2008. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. Environmental research 108:177-184.

Swedenborg E, Ruegg J, Makela S, Pongratz I. 2009. Endocrine disruptive chemicals: Mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. Journal of molecular endocrinology 43:1-10.

Tampio M, Loikkanen J, Myllynen P, Mertanen A, Vahakangas KH. 2008. Benzo(a)pyrene increases phosphorylation of p53 at serine 392 in relation to p53 induction and cell death in mcf-7 cells. Toxicology letters 178:152-159.

Tanaka J, Yonemoto J, Zaha H, Kiyama R, Sone H. 2007. Estrogen-responsive genes newly found to be modified by tcdd exposure in human cell lines and mouse systems. Mol Cell Endocrinol 272:38-49.

Tarrade A, Lai Kuen R, Malassine A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M, et al. 2001. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 81:1199-1211.

Tarrade A, Goffin F, Munaut C, Lai-Kuen R, Tricottet V, Foidart JM, et al. 2002. Effect of matrigel on human extravillous trophoblasts differentiation: Modulation of protease pattern gene expression. Biology of reproduction 67:1628-1637.

Tekpli X, Rissel M, Huc L, Catheline D, Sergent O, Rioux V, et al. 2010. Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis. Toxicology and applied pharmacology 243:68-76.

The European Parliament and the Council of the European Union. 2007. Directive 2007/47/ec of the european parliament and of the council.

Tian S, Pan L, Sun X. 2013. An investigation of endocrine disrupting effects and toxic mechanisms modulated by benzo[a]pyrene in female scallop chlamys farreri. Aquat Toxicol 144-145:162-171.

Tomatis L. 1973. Transplacental carcinogenesis. Dans: Modern trends in oncology. Part i. Research progress. Butterworths, London.

Tomita I, Nakamura Y, Aoki N, Inui N. 1982. Mutagenic carcinogenic potential of dehp and mehp. Environ Health Persp 45:119-125.

Tomita I, Nakamura Y, Yagi Y, Tutikawa K. 1986. Fetotoxic effects of mono-2-ethylhexyl phthalate (mehp) in mice. Environ Health Persp 65:249-254.

Topinka J, Milcova A, Libalova H, Novakova Z, Rossner P, Balascak I, et al. 2009. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part i: Bulky DNA adducts. Mutat Res-Fund Mol M 669:13-19.

Torry DS, McIntyre JA, Faulk WP. 1997. Immunobiology of the trophoblast: Mechanisms by which placental tissues evade maternal recognition and rejection. Curr Top Microbiol 222:127-140.

Toutain J. 2012. Cytogénétique placentaire des retards de croissance intra-utérins : Intérêts de la recherche des anomalies chromosomiques limitées au placenta et de l'estimation de la longueur télomérique placentaire:Bordeaux 2.

Toutain J, Prochazkova-Carlotti M, Cappellen D, Jarne A, Chevret E, Ferrer J, et al. 2013. Reduced placental telomere length during pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. PloS one 8:e54013.

Tung EW, Philbrook NA, Belanger CL, Ansari S, Winn LM. 2014. Benzo[a]pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: A possible mechanism for benzo[a]pyrene-induced toxicity. Mutation research Genetic toxicology and environmental mutagenesis 760:64-69.

Tyrer RH, Cantrell ET, Horres R, Lee IP, Peirano WB, Danner RM. 1981. Benzo[a]pyrene metabolism in mice exposed to diesel exhaust. Environment international 5:7.

Ulker V, Gurkan H, Tozkir H, Karaman V, Ozgur H, Numanoglu C, et al. 2013. Novel nlrp7 mutations in familial recurrent hydatidiform mole: Are nlrp7 mutations a risk for recurrent reproductive wastage? Eur J Obstet Gyn R B 170:188-192.

United States Food And Drug Administration. 2001. Safety assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate (dehp) released from pvc medical devices.

UnitedStatesEnvironmentalProtectionAgency. 2009. Endocrine disruptor screening program test guidelines oppts 890.1200: Aromatase (human recombinant).

Verhoef PA, Estacion M, Schilling W, Dubyak GR. 2003. P2x7 receptor-dependent blebbing and the activation of rho-effector kinases, caspases, and il-1 beta release. J Immunol 170:5728-5738.

Vijayapadma V, Ramyaa P, Pavithra D, Krishnasamy R. 2014. Protective effect of lutein against benzo(a)pyrene-induced oxidative stress in human erythrocytes. Toxicology and industrial health 30:284-293.

Villalobos M, Olea N, Brotons JA, Oleaserrano MF, Dealmodovar JMR, Pedraza V. 1995. The e-screen assay - a comparison of different mcf7 cell stocks. Environ Health Persp 103:844-850.

Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A. 1997. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat p2x7 receptor. Neuropharmacology 36:1285-1294.

Walker WH, Fitzpatrick SL, Barrera-Saldana HA, Resendez-Perez D, Saunders GF. 1991. The human placental lactogen genes: Structure, function, evolution and transcriptional regulation. Endocrine reviews 12:316-328.

Wang SJ, Wong G, de Heer AM, Xia W, Bourguignon LY. 2009. Cd44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. The Laryngoscope 119:1518-1530.

Wang X, Arcuino G, Takano T, Lin J, Peng WG, Wan P, et al. 2004. P2x7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. Nature medicine 10:821-827.

Wang Y, Zhai W, Wang H, Xia X, Zhang C. 2014. Benzo(a)pyrene promotes a549 cell migration and invasion through up-regulating twist. Archives of toxicology.

Warner M, Mocarelli P, Samuels S, Needham L, Brambilla P, Eskenazi B. 2011. Dioxin exposure and cancer risk in the seveso women's health study. Environ Health Persp 119:1700-1705.

Weuve J, Sanchez BN, Calafat AM, Schettler T, Green RA, Hu H, et al. 2006. Exposure to phthalates in neonatal intensive care unit infants: Urinary concentrations of monoesters and oxidative metabolites. Environ Health Persp 114:1424-1431.

Wice B, Menton D, Geuze H, Schwartz AL. 1990. Modulators of cyclic amp metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. Experimental cell research 186:306-316.

Willemsen P, Scippo ML, Maghuin-Rogister G, Martial JA, Muller M. 2002. Use of specific bioluminescent cell lines for the detection of steroid hormone (ant)agonists in meat producing animals. Anal Chim Acta 473:119-126.

Willemsen P, Scippo ML, Kausel G, Figueroa J, Maghuin-Rogister G, Martial JA, et al. 2004. Use of reporter cell lines for detection of endocrine-disrupter activity. Anal Bioanal Chem 378:655-663.

Wistuba, II, Gazdar AF, Minna JD. 2001. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. Seminars in oncology 28:3-13.

Wolstenholme J. 1996. Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16, and 22: Their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization. Prenatal Diag 16:511-524.

Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. 2005. Cell migration in tumors. Current opinion in cell biology 17:559-564.

Yan C, Wu W, Li H, Zhang G, Duerksen-Hughes PJ, Zhu X, et al. 2010. Benzo[a]pyrene treatment leads to changes in nuclear protein expression and alternative splicing. Mutation research 686:47-56.

Yan C, Chen Z, Li H, Zhang G, Li F, Duerksen-Hughes PJ, et al. 2012. Nuclear proteome analysis of benzo(a)pyrene-treated hela cells. Mutation research 731:75-84.

Yang G, Jiang Y, Rao K, Chen X, Wang Q, Liu A, et al. 2011. Mitochondrial dysfunction and transactivation of p53-dependent apoptotic genes in bap-treated human fetal lung fibroblasts. Human & experimental toxicology 30:1904-1913.

Yiu KW, Lee CK, Kwok KC, Cheung NH. 2014. Measuring the kinetics of the binding of xenoestrogens and estrogen receptor alpha by fluorescence polarization. Environmental science & technology.

Yokoyama WM. 1997. The mother-child union: The case of missing-self and protection of the fetus. P Natl Acad Sci USA 94:5998-6000.

Yokoyama Y, Okubo T, Kano I, Sato S, Kano K. 2003. Induction of apoptosis by mono(2-ethylhexyl)phthalate (mehp) in u937 cells. Toxicology letters 144:371-381.

Yoshikawa T, Brkanac Z, Dupont BR, Xing GQ, Leach RJ, Detera-Wadleigh SD. 1996. Assignment of the human nuclear hormone receptor, nuc1 (ppard), to chromosome 6p21.1-p21.2. Genomics 35:637-638.

Zhang L, Connor EE, Chegini N, Shiverick KT. 1995. Modulation by benzo[a]pyrene of epidermal growth factor receptors, cell proliferation, and secretion of human chorionic gonadotropin in human placental cell lines. Biochemical pharmacology 50:1171-1180.

Zhang L, Shiverick KT. 1997. Benzo(a)pyrene, but not 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, alters cell proliferation and c-myc and growth factor expression in human placental choriocarcinoma jeg-3 cells. Biochemical and biophysical research communications 231:117-120.

Zhang L, Bao Y, Li J. 2011. Nuclear respiratory factor-1 is involved in mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in human bronchial epithelial cells. Basic & clinical pharmacology & toxicology 109:115-122.

Zhang S, Qin C, Safe SH. 2003. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: Effects of structure and cell context. Environmental health perspectives 111:1877-1882.

Zhang Y, Lin L, Cao Y, Chen B, Zheng L, Ge RS. 2009. Phthalate levels and low birth weight: A nested case-control study of chinese newborns. The Journal of pediatrics 155:500-504.

Zhang YH, Lin L, Cao Y, Chen BH, Zheng LX, Ge RS. 2009. Phthalate levels and low birth weight: A nested case-control study of chinese newborns. J Pediatr-Us 155:500-504.

Zhao P, Fu J, Yao B, Song Y, Mi L, Li Z, et al. 2012. In vitro malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by benzo(a)pyrene. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA 26:362-368.

Zhu W, Cromie MM, Cai Q, Lv T, Singh K, Gao W. 2014. Curcumin and vitamin e protect against adverse effects of benzo[a]pyrene in lung epithelial cells. PloS one 9:e92992.

Zwahlen M, Gerber S, Bersinger NA. 2007. First trimester markers for pre-eclampsia: Placental vs. Non-placental protein serum levels. Gynecologic and obstetric investigation 63:15-21.

ANNEXES

Annexe A. Article 1

Soumis dans la revue European Journal of Pharmaceutical Sciences

Anaïs WAKX, Anne REGAZZETTI, Delphine DARGERE, Nicolas AUZEIL, Sophie GIL, Danièle EVAIN-BRION, Olivier LAPREVOTE, Patrice RAT

Role of P2X7 receptor and lipid raft modifications in benzo[a]pyrene toxicity on human placental cells

ROLE OF P2X7 RECEPTOR AND LIPID RAFT MODIFICATIONS IN BENZO[A]PYRENE TOXICITY ON HUMAN PLACENTAL CELLS

Anaïs Wakx [1,2], Anne Regazzetti [1], Delphine Dargère [1], Nicolas Auzeil [1], Sophie Gil [2,3], Danièle Evain-Brion [2,3], Olivier Laprévote [1], Patrice Rat [1]

[1] UMR 8638 CNRS COMETE, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

[2] Fondation PremUp, 4 avenue de l'Observatoire, 75014 Paris, France

[3] INSERM U1139, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

Corresponding author: patrice.rat@parisdescartes.fr

+33 1 53 73 98 21

Running title: benzo(a)pyrene effects on human placental cells

Acknowledgments: This study was supported by ANR PLACENTOX (ANR-11-CESA-0002)

Keywords : benzo(a)pyrene, placental cells, P2X7 receptor, in vitro, toxicity, DNA damage

ABSTRACT

Placenta supports normal growth of fetus but most of the studies carried out on placenta to assess risks for pregnancy consider it as a barrier between mother and fetus. Here, we chose to consider placenta as a target organ for pollutants. Benzo(a)pyrene (BaP) is a persistent environmental pollutant and a human carcinogenic molecule. Our aim was to highlight the potential risks for placenta and then pregnancy of BaP exposure using a model of human placental cells. JEG-3 trophoblast cell line was incubated with BaP at 0.1-10 µM for 72h. BaP metabolization was confirmed using cytometry and mass spectrometry. BaP induced neither loss of cell viability nor apoptosis up to 10µM, as we observed in microplate and flow cytometry. BaP increased ZO-1 expression (confocal microscopy observations and flow cytometry quantification) and phosphatidylserine externalization in outer plasma membrane. We also observed that BaP led to lipid raft modifications through an increase in caveolin-1 expression and to activation of P2X7 cell degenerescence receptor. BaP induced cell accumulation in cell cycle G2/M phase associated to the inhibition of cell proliferation. The trophoblast cell line JEG-3 appears to be a relevant model to evaluate placental toxicity of molecules suspected to be at risk for pregnancy. Placenta should be included in toxicological studies to better understand mechanisms underneath pregnancy disorders.

INTRODUCTION

Pregnant women and their fetus can be daily exposed to pollutants. Within the human placenta, the trophoblast covering the placental villi supports the normal growth and development of the fetus by coordinating exchanges of nutrients and wastes between maternal and fetal circulatory systems and by secreting numerous hormones.

Most of the studies carried out on placenta to study risks for the pregnancy consider it as a barrier between mother and fetus but not as an organ required for fetal development. Moreover placental dysfunctions are commonly associated to pregnancy disorders, such as miscarriage or preeclampsia (Ball et al., 2006; Burton and Jauniaux, 2004; Goldman-Wohl and Yagel, 2002; Sebire et al., 2002). So, it is of most importance to conceive placenta as a target organ and not just as a barrier.

Benzo(a)pyrene (BaP), a member of the large polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) family, is a persistent environmental pollutant. This five-ring compound is commonly found in cigarette smoke, food and urban pollution. BaP is known for its cytotoxic, mutagenic and carcinogenic properties, and is classified as a human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (Aust et al., 1980; Brookes, 1977; Huberman and Sachs, 1966; IARCWorkingGroup, 2010). BaP enters human cells and is metabolized by cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and 1B1 (CYP1B1) to different compounds (Anderson et al., 1981). Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE), the most carcinogenic BaP metabolite, can bind macromolecules such as DNA to form mutagenic adducts (Wood et al., 1976). Recent studies suggested that BaP affects differentiation of trophoblast cells and hormone release (Le Vee et al., 2014) and alters placental vasculature (Detmar et al., 2008).

Our aim was to study *in vitro* BaP toxicity on a human placental cell line in order to highlight the potential risks for placenta and then pregnancy. As BaP is a lipophilic

compound and cross plasma membrane, we identified three membrane biomarkers of BaP exposure: P2X7 receptor, tight junction ZO-1 protein and lipid raft-associated caveolin-1 protein.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and incubation

The JEG-3 human trophoblast cell line (ATCC HTB-36) was cultured in Minimum Essential Medium Eagle's medium, supplemented with 10 % FBS, 1 % L-glutamine, 0.5 % penicillin and streptomycin. Confluent cultures in flasks were removed by trypsin incubation, and then the cells were seeded into microplates for cytometry, petri dishes for nuclear extraction or slide chambers for confocal microscopy and kept at 37°C for 24 h. After 24 h, the cells were incubated with BaP (Sigma, France) dissolved in DMSO for 24 h or 72 h. Maximal final concentration of DMSO on cells was 0.025 % (v/v).

CYP1A1 and CYP1B1 induction: 7-EROD assay

The 7-EROD probe enters cells and is metabolized in resorufin by CYP1A1 and CYP1B1. After BaP incubation, a 2 µM solution of 7-EROD (Sigma-Aldrich) was distributed in wells and the microplate was placed at 37°C for 6 h. The fluorescence signal was then scanned (λ_{exc} = 535 nm, λ_{em} = 600 nm) using a microplate reader (Safire; Tecan®, Switzerland).

BaP metabolization: mass spectrometry analysis

Sample preparation

After BaP incubation at 10 µM, the cells were removed from the flask by trypsin incubation and rinced twice with PBS. Cell pellets were subsequently reconstituted in 1 mL of water, spiked with 50 µL of internal standard 50 mM and sonicated for 5 min at 4°C. The cell homogenates were extracted twice with 2 mL of dichloromethane and 2 mL of ethyl acetate. Dried extracts were resuspended in 100 µL in methanol/acetonitrile mixture (1:1, v/v, J.T. Baker, USA) and 5 µL were injected into the UPLC-APPI-MS system (see below).

Cell supernatants (1mL) were spiked with 50 µL of internal standard 50 mM and extracted twice with 2 mL of dichloromethane and 2 mL of ethyl acetate. Dried extracts were resuspended in 100 µL in methanol/acetonitrile mixture (1:1, v/v) and 5 µL were injected into the UPLC-APPI-HRMS system. The metabolites identification was performed with the same protocol using 10 mL of cell supernatant which were extracted by 40 mL of organic solvents.

Sample analysis

All samples were analyzed by reversed phase ultra-performance liquid chromatography (ACQUITY UPLC®, Waters, Manchester, UK) coupled to an hybrid quadrupole - orthogonal Time-of-Flight mass spectrometer (SYNAPT® G2 High Definition MS™, Waters) equipped with an atmospheric pressure photoionization (APPI) source (IonSABRE™ APPI-APCI-Dual-Mode Ionization Source, Waters, Manchester, UK). The whole analytic system will be referred as UPLC-APPI-MS hereafter. BaP, and BaP metabolites chromatographic separations were performed on a CSH C18 1.8 µm column (2.1 x 100 mm) thermostated at 25°C at a flow rate of 0.40 mL/min using water containing 0.01 % (v/v) formic acid (solvent A) and acetonitrile

(solvent B). For BaP quantitation, chromatography was performed using 15 % A and 85 % B isocratically for 5 min. For identification of BaP metabolites, the column ramped from 40 % B to 85 % B (curve 6) over 10 min and was held at 85 % B for 5 min before a rapid return to 40 % B followed by an equilibration period of 2.5 min. Data were collected separately both in positive ions mode. A second pump (LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japan) was used to deliver a toluene/anisole mixture (1:1, v/v) used as a photoionizer dopant at a flow rate 0.05 mL/min. The APPI source was operated with a 10 eV krypton discharge UV lamp. Ionization of analytes was achieved in the positive ion mode. Parameters were as follows: source temperature 120°C, desolvation temperature 400°C, cone gas flow 20 L/h, desolvation gas flow 900 L/h, extraction cone 4 V, sampling cone 35 V, APPI source transfer voltage 1 kV. The mass spectrometer was operated in the MS sensibility mode. Centroided accurate mass spectra were acquired over the *m/z* range 50-1000 with a scan time of 0.1 s and an interscan delay of 0.01 s using a target mass resolution of 21500 (FWHM as defined at *m/z* 500).

Cell viability: neutral red assay

Lysosomal membrane activity is closely related to cell viability. The neutral red dye penetrates cells and accumulates in lysosomes after binding to the lysosomal matrix of viable cells. In accordance with the validated protocol of Borenfreund and Puerner, neutral red solution at 0.05 g/L was added to the cells and incubated for 3 hours at 37°C (Borenfreund and Puerner, 1985). After wash with PBS, the dye was extracted from the viable cells with a solution of acetic acid-ethanol (1 % of acid acetic, 50,6 % of ethanol in water, v/v). After agitation for 30 min, the neutral red fluorescence was measured (λ_{exc}= 535 nm; λ_{em}= 600 nm) in accordance with our validated protocol (Dutot et al., 2010; Rat et al., 1994).

Apoptosis assessment: p53 phosphorylation on serine 46

p53 total protein and p53 phosphorylated on serine 46 levels were determined according to the manufacturer's instructions (Cyclex, Clinisciences, France).

Nuclei were extracted following manufacturer's instructions then ELISAs were performed on nuclear extracts.

Apoptosis assessment: Chromatin condensation - Nuclear-ID Green assay

Chromatin condensation was determined according to the manufacturer's instructions (Enzo Life Sciences, France). Cells were incubated with the probe solution for 30 min at room temperature. Fluorescence signal was then read (λ_{ex}= 488 nm; λ_{em}= 520 nm).

Apoptosis assessment: DNA fragmentation (SubG1 peak) evaluation

Subconfluent cells were harvested with trypsin-EDTA, pelleted and washed in PBS. They were then permeabilized in PBS containing 0.1 % Triton-X100 and 0.5 mg/mL bovine ribonuclease A for 5 minutes at 4°C. Then, the cells were stained with propidium iodide for 3 minutes at 4°C. After resuspension in PBS, the cells were analyzed by flow cytometry (C6Flow Cytometer®, Accuri Cytometers, St. Ives, UK).

Genotoxicity: DNA double-strand break - γH2AX expression

Following our adaptation of Audebert's protocol (Audebert et al., 2010), the cells were fixed for 20 minutes using paraformaldehyde 2% then paraformaldehyde was neutralized using 20mM NH_4Cl for 2 minutes. Then, the cells were permeabilized (Triton X-100, 0.2%) and blocked with a PBS solution containing 10% of fetal bovine serum and 0.2%Triton X-100 for 1 hour. The cells were incubated with primary antibody (rabbit anti-γH2AX, 1/200, Cell

signaling, Leiden, The Netherlands) for 2 hours, then with secondary antibody (Dylight 800 conjugate anti-rabbit IgG, 1/500, Cell signaling) for 1 hour. Nuclei were stained with TO-PRO-3 at 2µg/µL. The fluorescence signal was then scanned (λ_{exc} = 700 nm then 800 nm) using an infrared microplate reader (Odyssey, Li-cor ScienceTec). Fluorescence signal corresponding to γH2AX expression was normalized by fluorescence signal corresponding to DNA content.

Genotoxicity: DNA single-strand break - picogreen assay

The cells were collected then lysed on ice for 30 minutes in a lysis buffer (10mM Tris pH8, 1mM EDTA, 0.2% Triton X-100 in purified water). Then, DNA was stained with picogreen (Invitrogen) for 5 minutes. Fluorescence signal was then read (λ_{exc}= 460 nm; λ_{em}= 540 nm) then normalized by protein content for each condition.

Cell cycle analysis

Cell cycle was analyzed using quantification of DNA content. Proliferating cells were harvested with trypsin-EDTA, pelleted and washed in PBS. They were then permeabilized in PBS containing 0.1 % Triton-X100 and 0.5 mg/mL bovine ribonuclease A for 5 minutes at 4°C. Then, the cells were stained with propidium iodide for 3 minutes at 4°C. After resuspension in PBS, the cells were analyzed by flow cytometry (C6Flow Cytometer®, Accuri Cytometers, St. Ives, UK).

Cell proliferation

Cells in proliferation were incubated with BaP. Every day for 4 days, the cells were harvested with trypsin-EDTA and counted using a Thoma cell counting chamber.

Plasma membrane and lipid raft assessment: caveolin-1 and Zonula Occludens-1 (ZO-1) expression

The cells were harvested with trypsin-EDTA and incubated with rabbit anti-caveolin-1 antibody (1.8 µg/mL, Sigma-Aldrich) or rabbit anti-ZO-1 antibody (2.5 µg/mL, Zymed laboratories, France) diluted in PBS containing 0.5 % of bovine serum albumin for 45 minutes at 4°C. After wash, the cells were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-rabbit or Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody for 30 minutes at 4°C. Flow cytometric quantitation of fluorescence was measured using C6 Flow Cytometer® (Accuri Cytometers, St. Ives, UK).

Plasma membrane assessment: phosphatidylserine localization

The cells were fixed for 20 minutes using paraformaldehyde (PFA 2 %) at room temperature then incubated with annexin-V for 15 minutes (Noble et al., 1999). Vectashield was used as mounting medium and slides were observed under a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica Microsystems) equipped with a x40 oil-immersion objective. Confocal imaging was performed at the Cellular and Molecular Imaging Facility (UMS 3612 CNRS, US 25 INSERM, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, Paris, France).

Plasma membrane and lipid raft assessment: P2X7 and ZO-1 expression by immunofluorescence

The cells were fixed, permeabilized, and then incubated with primary antibody (rabbit anti-P2X7 at 10 µg/mL, Santa Cruz Biotechnology, Germany, or rabbit anti-ZO-1 at 5 µg/mL, Zymed Laboratories, France) for 1 h, then with secondary antibody (Alexa Fluor 488 goat

anti-rabbit IgG). Nuclei were stained with TO-PRO-3 at 2µg/µL. Vectashield was used as mounting media and slides were observed under confocal microscope.

P2X7 pore opening: YO-PRO-1 assay

YO-PRO-1, a fluorogenic probe, enters cells through P2X7 receptor activation-induced pores and emits fluorescence when it binds DNA (Idziorek et al., 1995; Surprenant et al., 1996). Following our validated protocol, a 2 µM YO-PRO-1 solution was distributed in wells and the microplate was placed at room temperature away from light for 10 minutes (Dutot et al., 2006). The fluorescence signal was then scanned (λ_{exc} = 491 nm, λ_{em} = 509 nm).

P2X7 canal function: calcium dosage - Fluo-4 direct calcium assay kit

Cellular calcium level was determined according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, The Netherlands). Cells were incubated with Fluo-4 probe solution for 30 min. Fluorescence signal was then read (λ_{exc}= 494 nm; λ_{em}= 516 nm).

Plasma membrane and lipid raft assessment: P2X7 expression by In Cell Western

According to Audebert's protocol (Audebert et al., 2010), the cells were fixed, permeabilized, and then blocked with 10 % fetal calf serum and 0.2 % Triton in PBS for 1h. The cells were incubated with primary antibody (rabbit anti-P2X7 at 10µg/mL) for 2 h then with an infrared fluorescent dye conjugated antibody (IRDye™ 800CW, Rockland) and TO-PRO-3 for DNA labelling (Invitrogen, France) for 1 h. Infrared fluorescence (800 nm) and TO-PRO-3 fluorescence (700 nm) were simultaneously read using an infrared imaging scanner (Odyssey, Li-Cor Science Tec, France). Fluorescence of TO-PRO-3 and infrared P2X7 antibody staining were analysed by Image J software. The ratio between the intensity of infrared

emission of P2X7 antibody and TO-PRO-3 was calculated in arbitrary units to quantify the level of P2X7 expression.

Results exploitation and statistical analysis

All microtitration data were obtained in fluorescence or absorbance units and expressed as a percentage of the negative control (culture medium) or as relative units compared to negative control. Each point was tested in 6 different wells and experiments were reproduced in triplicate. Cell counting and flow cytometry experiments were reproduced in triplicate. Data are expressed as means ± standard deviation. The mean values for each test were analyzed by a one-way ANOVA followed by Dunnett's test (Sigma Stat 2.0; Chicago, Illinois, USA) and the level of significance was fixed at 0.05. Data obtained by confocal microscopy were representative of 3 independent experiments. No difference was observed between negative control (culture medium) and solvent (DMSO) (data not shown).

RESULTS

CYP1A1 and CYP1B1 induction in JEG-3 cells was observed after BaP incubation at 1 and 10 µM (x7.35 and x1.43, respectively, compared to negative control) (Fig.1). The metabolization of BaP by CYP1A1 and CYP1B1 was decreased (x2.63 instead of x7.35) or totally abolished (x1.13 instead of x1.43) when the cells were pre-incubated with a CYP1A1 and CYP1B1 inhibitor, apigenin at 30 µM.

In order to confirm BaP metabolization, its putative oxidized metabolites were detected in cell pellets and supernatants using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (Fig.2). BaP and its metabolites were detected at *m/z* values corresponding to

the $M^{+\bullet}$ ions. No metabolites were detected in culture medium free of cells, indicating no degradation of BaP due to chemical oxidation (Fig. 2A and Table 1). Moreover, neither BaP nor oxidized metabolites were found in cell culture supernatants and cell pellets incubated in culture medium free of BaP (Fig.2B and 2C top panels and Table 1). These results indicated that culture medium and JEG-3 cells used in our study were not contaminated by exogenous source of BaP. Besides, following incubation with BaP 10 µM, we detected not only BaP in supernatants and cell pellets but also few oxidized metabolites (Fig. 2B and 2C bottom panel and Table 1).

No loss of cell viability was detected after incubation with BaP up to 10 µM for 72h on JEG-3 cells (Fig.3A). Moreover, neither change in p53 phosphorylation on serine 46 nor chromatin condensation nor DNA fragmentation were observed, whatever may be the concentration of BaP (Fig.3B, 3C and 3D). However, BaP induced an increase in γH2AX expression in a concentration-dependent manner, from 0.1µM (x1.40 at 0.1 µM, x1.80 at 1 µM and x2.22 at 10 µM, Fig.4A). A decrease in DNA double-strand content was also observed after BaP incubation at 1 and 10µM (respectively x0.50 and x0.36, Fig.4B).

BaP at 1 and 10 µM induced cell accumulation in G2/M phase compared to negative control, whereas it didn't affect cell cycle at 0.1 µM (Fig.5A). After 72 h, BaP at 1 µM and 10 µM decreased significantly the proliferation of JEG-3 cells compared to negative control. In contrast, BaP at 0.1 µM that had no significant effect up to 4 days (Fig.5B).

Flow cytometry results showed that BaP at 1 µM and 10 µM significantly increased plasma membrane caveolin-1 expression (x4.02 at 1 µM and x5.11 at 10 µM) but not at 0.1 µM compared to negative control (Fig.6A). Moreover, BaP at 10 µM increased the

fluorescence signal of annexin V in non-permeabilized cells and consequently the localization of phosphatidylserines in the outer plasma membrane (Fig.6B).

As shown in our flow cytometry results, ZO-1 expression was significantly increased in JEG-3 cells, after BaP incubation in a concentration-dependent manner (x1.21 at 0.1 µM, x3.73 at 1 µM and x5.21 at 10 µM, Fig.7A). ZO-1 labeling for confocal microscopy showed a stronger fluorescence of cell membrane after BaP incubation than in negative control, which is in accordance with BaP-induced ZO-1 overexpression observed in flow cytometry (Fig.7B).

The expression of P2X7 receptor in JEG-3 cells was confirmed by confocal microscopy analysis. As shown in figure 8A, isotype control showed no significant labeling whereas cells immunostained with both primary and secondary antibody showed strong labeling.

P2X7 pore opening, reflecting P2X7 receptor activation, was detected performing the YO-PRO-1 assay. Fluorescence signal, associated to P2X7 pore opening, significantly increased after BaP incubation compared to negative control (x1.33 at 0.1 µM, x1.43 at 1 µM and x1.75 at 10 µM, Fig. 8B). Ionic channel function of P2X7 receptor was evaluated by calcium dosage. Cellular calcium fluorescence signal was significantly higher after 10 µM BaP incubation than in negative control (1.32 vs 1.00), whereas BaP at 0.1 µM and 1 µM had no effect (Fig.8C). P2X7 receptor expression was studied by In Cell Western. The ratio green/red fluorescence, indicative of P2X7 receptor expression compared to DNA content, significantly increase after BaP incubation compared to negative control (x1.25 at 0.1 µM, x1.46 at 1 µM and x1.54 at 10 µM, Fig. 8D). P2X7 labeling for confocal microscopy showed a stronger fluorescence after BaP incubation than in negative control, which is in accordance with BaP-induced P2X7 overexpression observed by In Cell Western.

DISCUSSION

In toxicological studies, placenta is mainly considered as a barrier to study placental transport of toxic compounds from mother to fetus. Our study showed that placenta is not only a barrier between mother and fetus but also a specific target organ for toxic compounds that can perturb pregnancy and fetal development.

First, we checked that BaP was metabolized by our cell model. After BaP incubation, the presence of this pollutant was detected in JEG-3 trophoblast cells using mass spectrometry. This result indicates that BaP can cross plasma membrane and is supported by the fact that no endogenous BaP was detected in cells. Moreover, metabolites of BaP were also detected in cells and cell supernatants, indicating that our trophoblast cell model metabolized and excreted this PAH. The fact that no exogenous source of BaP in the medium was detected indicates that these metabolites cannot be produced by chemical oxidation.

Neither BaP up to 10µM nor its metabolites induced loss of cell viability or apoptosis. Indeed, BaP led to no change in pro-apoptotic marker p53 protein phosphorylated on serine 46 level, chromatin condensation nor DNA fragmentation in our study. However, previous *in vitro* studies showed that BaP induced cell death by necrosis and apoptosis in lung, liver and kidney cells at lower concentrations or shorter incubation duration than the ones used in our study (Jiang et al., 2013; Jiang et al., 2012; Umannova et al., 2011; Zhang et al., 2014; Zhu et al., 2014). We suggest that placental cells has specific responses and protection mechanisms compared to other cell types and it reinforces the idea that placenta is a fully-fledged organ to study BaP or other chemicals toxicity. Although no loss of cell viability or apoptosis was observed, BaP induced both DNA single- and double-strand breaks on JEG-3 trophoblast cells. Indeed, BaP increases γH2AX expression, which is a protein implicated in DNA double-strand break repair. This result suggests that BaP induced DNA double-strand break which

can be repair. But as this repair is not error-free, it can contribute to BaP toxicity. In our study, BaP also decreased DNA double-strand content, which suggests that BaP induced DNA single-strand breaks. So, BaP led to DNA breaks in JEG-3 trophoblast cell line, which is in accordance with previous studies (Einaudi et al., 2014; Garry et al., 2003; Jeng et al., 2013; Tung et al., 2014).

DNA damage can be associated to cell cycle arrest and consequently to decrease in cell proliferation (Chen et al., 2010; Zhou and Elledge, 2000), so we focused our interest on these two parameters. Our results showed that BaP inhibited cell proliferation with a G2/M phase cell cycle arrest of proliferating cells. Decrease in cell proliferation has already been observed after trophoblast cells incubation with BaP (Zhang et al., 1995; Zhang and Shiverick, 1997) whereas carcinogens usually lead to an increase in cell proliferation (Cohen and Ellwein, 1990). Placental cells differ from other cell types in their response to toxic chemicals during carcinogenesis and, consequently, are unique. BaP, as other CYP1A1 activators, inhibits epidermal growth factor fixation to its membranous receptor on placenta and reduces epidermal growth factor extracellular levels, which could explain in part the decrease in cell proliferation (Guyda et al., 1990; McGarry et al., 2002). BaP-induced inhibition of cell proliferation and cell cycle arrest in trophoblasts and thus could have a possible impact on pregnancy and fetal growth (Rappolee et al., 2010).

As BaP crosses plasma membrane, we focused our attention on lipid raft domains to identify biomarker of exposure. Those specific microdomains of plasma membrane are enriched in proteins, such as caveolin-1 or phosphatidylserine, and known to be perturbed by some exogen molecules (Bruyere et al., 2011; Elyassaki and Wu, 2006). We showed that BaP at low concentration led to plasma membrane remodeling, including an increased in caveolin-1 expression and the externalization of phosphatydiserines in the outer plasma

membrane, and a modification of tight junctions, characterized by an increase in ZO-1 expression. Tekpli et al. showed that BaP alters the lipid composition of lipid rafts domains and Gorria et al. that membrane fluidity changes after BaP incubation (Gorria et al., 2006; Tekpli et al., 2012; Tekpli et al., 2010). BaP has a double effect on placental cell membranes: it increases cell and formation of cholesterol-rich membrane microdomains. P2X7 receptor is a purinergic receptor mainly activated by ATP present in membrane microdomains (Barth et al., 2007; Pfleger et al., 2012). Upon activation, P2X7 receptor forms either a cationic channel or a large permeation pore. P2X7 receptor has been implicated in many cellular pathways: inflammation, apoptosis, carcinogenesis, but also in degenerative disease and oxidative stress (Adinolfi et al., 2012; Chen et al., 2013; Humphreys and Dubyak, 1998; Labasi et al., 2002; Parvathenani et al., 2003; Solini et al., 2013). In the present study, we showed for the first time that P2X7 receptor is expressed by JEG-3 trophoblast cell line. Roberts et al. and Divald et al. have detected P2X7 expression on human trophoblasts primary culture, we suggest that JEG-3 cells are a coherent *in vitro* model for toxicological studies (Roberts et al., 2006; Roberts et al., 2007). BaP stimulated P2X7 pore formation associated to an increase in cellular calcium content, this PAH therefore modifies BaP both P2X7 pore permeation and channel function. To sum up, BaP promotes cell tightness and lipid raft recruitment that facilitate P2X7 activation and pore formation. Furthermore, BaP is a carcinogenic pollutant and P2X7 receptor has been found to be overexpressed and/or activated in several cancers (Adinolfi et al., 2002; Raffaghello et al., 2006; Slater et al., 2004a; Slater et al., 2004b; Solini et al., 2008; Takai et al., 2012). In JEG-3 cells, we showed that P2X7 receptor is not only overexpressed but also activated after BaP incubation which reinforces the interest of this cell line as a pertinent model to study BaP effects.

The trophoblast JEG-3 cell line appears to be a relevant model to evaluate placental toxicity of molecules suspected to be at risk for pregnancy. Here we showed that placental cells might respond in an organ-specific manner to chemicals. We identified biomarkers of BaP exposure at BaP subtoxic concentrations in our study. Indeed, BaP induced trophoblast cell membrane modifications characterized by Cav-1 overexpression, P2X7 receptor overexpression and activation, cell cycle arrest and inhibition of cell proliferation. Further studies are required using physiological models of human placental studies but our results suggest possible biomarkers, which could be helpful for a better understanding of placental tissue degeneration mechanisms in pregnancy disorders or in cancer and placenta should be included in toxicological studies to better understand mechanisms underneath pregnancy disorders.

REFERENCES

Adinolfi, E., Melchiorni, L., Falzoni, S., Chiozzi, P., Morelli, A., Tieghi, A., Cuneo, A., Castoldi, G., Di Virgilio, F., Baricordi, O.R., 2002. P2X(7) receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. Blood 99, 706-708.

Adinolfi, E., Raffaghello, L., Giuliani, A.L., Cavazzini, L., Capece, M., Chiozzi, P., Bianchi, G., Kroemer, G., Pistoia, V., Di Virgilio, F., 2012. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. Cancer research 72, 2957-2969.

Anderson, M.W., Boroujerdi, M., Wilson, A.G., 1981. Inhibition in vivo of the formation of adducts between metabolites of benzo(a)pyrene and DNA by butylated hydroxyanisole. Cancer research 41, 4309-4315.

Audebert, M., Riu, A., Jacques, C., Hillenweck, A., Jamin, E.L., Zalko, D., Cravedi, J.P., 2010. Use of the gamma H2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. Toxicology letters 199, 182-192.

Aust, A.E., Falahee, K.J., Maher, V.M., McCormick, J.J., 1980. Human cell-mediated benzo(a)pyrene cytotoxicity and mutagenicity in human diploid fibroblasts. Cancer research 40, 4070-4075.

Ball, E., Bulmer, J.N., Ayis, S., Lyall, F., Robson, S.C., 2006. Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. The Journal of pathology 208, 535-542.

Barth, K., Weinhold, K., Guenther, A., Young, M.T., Schnittler, H., Kasper, M., 2007. Caveolin-1 influences P2X7 receptor expression and localization in mouse lung alveolar epithelial cells. The FEBS journal 274, 3021-3033.

Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology letters 24, 119-124.

Brookes, P., 1977. Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutation research 39, 257-283.

Bruyere, C., Abeloos, L., Lamoral-Theys, D., Senetta, R., Mathieu, V., Le Mercier, M., Kast, R.E., Cassoni, P., Vandenbussche, G., Kiss, R., Lefranc, F., 2011. Temozolomide Modifies Caveolin-1 Expression in Experimental Malignant Gliomas In Vitro and In Vivo. Transl Oncol 4, 92-100.

Burton, G.J., Jauniaux, E., 2004. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. Journal of the Society for Gynecologic Investigation 11, 342-352.

Chen, J.H., Tsou, T.C., Chiu, I.M., Chou, C.C., 2010. Proliferation inhibition, DNA damage, and cell-cycle arrest of human astrocytoma cells after acrylamide exposure. Chemical research in toxicology 23, 1449-1458.

Chen, S., Ma, Q., Krafft, P.R., Chen, Y., Tang, J., Zhang, J., Zhang, J.H., 2013. P2X7 receptor antagonism inhibits p38 mitogen-activated protein kinase activation and ameliorates neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats. Critical care medicine 41, e466-474.

Cohen, S.M., Ellwein, L.B., 1990. Cell proliferation in carcinogenesis. Science 249, 1007-1011.

Detmar, J., Rennie, M.Y., Whiteley, K.J., Qu, D.W., Taniuchi, Y., Shang, X.Y., Casper, R.F., Adamson, S.L., Sled, J.G., Jurisicova, A., 2008. Fetal growth restriction triggered by polycyclic aromatic hydrocarbons is associated with altered placental vasculature and AhR-dependent changes in cell death. Am J Physiol-Endoc M 295, E519-E530.

Dutot, M., Pouzaud, F., Larosche, I., Brignole-Baudouin, F., Warnet, J.M., Rat, P., 2006. Fluoroquinolone eye drop-induced cytotoxicity: role of preservative in P2X7 cell death receptor activation and apoptosis. Investigative ophthalmology & visual science 47, 2812-2819.

Dutot, M., Reveneau, E., Pauloin, T., Fagon, R., Tanter, C., Warnet, J.M., Rat, P., 2010. Multipurpose solutions and contact lens: modulation of cytotoxicity and apoptosis on the ocular surface. Cornea 29, 541-549.

Einaudi, L., Courbiere, B., Tassistro, V., Prevot, C., Sari-Minodier, I., Orsiere, T., Perrin, J., 2014. In vivo exposure to benzo(a)pyrene induces significant DNA damage in mouse oocytes and cumulus cells. Hum Reprod 29, 548-554.

Elyassaki, W., Wu, S.Y., 2006. Lipid rafts mediate ultraviolet light-induced fas aggregation in M624 melanoma cells. Photochem Photobiol 82, 787-792.

Garry, S., Nesslany, F., Aliouat, E., Haguenoer, J.M., Marzin, D., 2003. Assessment of genotoxic effect of benzo[a]pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay. Mutation research 534, 33-43.

Goldman-Wohl, D., Yagel, S., 2002. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. Molecular and cellular endocrinology 187, 233-238.

Gorria, M., Tekpli, X., Sergent, O., Huc, L., Gaboriau, F., Rissel, M., Chevanne, M., Dimanche-Boitrel, M.T., Lagadic-Gossmann, D., 2006. Membrane fluidity changes are associated with benzo[a]pyrene-induced apoptosis in F258 cells: protection by exogenous cholesterol. Annals of the New York Academy of Sciences 1090, 108-112.

Guyda, H.J., Mathieu, L., Lai, W., Manchester, D., Wang, S.L., Ogilvie, S., Shiverick, K.T., 1990. Benzo(a)pyrene inhibits epidermal growth factor binding and receptor autophosphorylation in human placental cell cultures. Molecular pharmacology 37, 137-143.

Huberman, E., Sachs, L., 1966. Cell susceptibility to transformation and cytotoxicity by the carcinogenic hydrocarbon benzo[a]pyrene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 56, 1123-1129.

Humphreys, B.D., Dubyak, G.R., 1998. Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. Journal of leukocyte biology 64, 265-273.

IARCWorkingGroup, 2010. Benzo[a]pyrene monography. International Agency for the research on Cancer.

Idziorek, T., Estaquier, J., De Bels, F., Ameisen, J.C., 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. Journal of immunological methods 185, 249-258.

Jeng, H.A., Yordt, D., Davis, S., Swanson, J.R., 2013. Assessment of alteration of reproductive system in vivo induced by subchronic exposure to benzo(a)pyrene via oral administration. Environmental toxicology.

Jiang, Y., Chen, X., Yang, G., Wang, Q., Wang, J., Xiong, W., Yuan, J., 2013. BaP-induced DNA damage initiated p53-independent necroptosis via the mitochondrial pathway involving Bax and Bcl-2. Human & experimental toxicology 32, 1245-1257.

Jiang, Y., Rao, K., Yang, G., Chen, X., Wang, Q., Liu, A., Zheng, H., Yuan, J., 2012. Benzo(a)pyrene induces p73 mRNA expression and necrosis in human lung adenocarcinoma H1299 cells. Environmental toxicology 27, 202-210.

Labasi, J.M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M.M., Brissette, W., Wicks, J.R., Audoly, L., Gabel, C.A., 2002. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. J Immunol 168, 6436-6445.

Le Vee, M., Kolasa, E., Jouan, E., Collet, N., Fardel, O., 2014. Differentiation of human placental BeWo cells by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. Chemico-biological interactions 210, 1-11.

McGarry, M.A., Charles, G.D., Medrano, T., Bubb, M.R., Grant, M.B., Campbell-Thompson, M., Shiverick, K.T., 2002. Benzo(a)pyrene, but not 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, alters cell adhesion proteins in human uterine RL95-2 cells. Biochemical and biophysical research communications 294, 101-107.

Noble, J.M., Thomas, T.H., Ford, G.A., 1999. Effect of age on plasma membrane asymmetry and membrane fluidity in human leukocytes and platelets. The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences 54, M601-606.

Parvathenani, L.K., Tertyshnikova, S., Greco, C.R., Roberts, S.B., Robertson, B., Posmantur, R., 2003. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. The Journal of biological chemistry 278, 13309-13317.

Pfleger, C., Ebeling, G., Blasche, R., Patton, M., Patel, H.H., Kasper, M., Barth, K., 2012. Detection of caveolin-3/caveolin-1/P2X7R complexes in mice atrial cardiomyocytes in vivo and in vitro. Histochemistry and cell biology 138, 231-241.

Raffaghello, L., Chiozzi, P., Falzoni, S., Di Virgilio, F., Pistoia, V., 2006. The P2X(7) receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. Cancer research 66, 907-914.

Rappolee, D.A., Awonuga, A.O., Puscheck, E.E., Zhou, S., Xie, Y., 2010. Benzopyrene and experimental stressors cause compensatory differentiation in placental trophoblast stem cells. Systems biology in reproductive medicine 56, 168-183.

Rat, P., Korwin-Zmijowska, C., Warnet, J.M., Adolphe, M., 1994. New in vitro fluorimetric microtitration assays for toxicological screening of drugs. Cell biology and toxicology 10, 329-337.

Roberts, V.H., Greenwood, S.L., Elliott, A.C., Sibley, C.P., Waters, L.H., 2006. Purinergic receptors in human placenta: evidence for functionally active P2X4, P2X7, P2Y2, and P2Y6. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 290, R1374-1386.

Roberts, V.H., Waters, L.H., Powell, T., 2007. Purinergic receptor expression and activation in first trimester and term human placenta. Placenta 28, 339-347.

Sebire, N.J., Fox, H., Backos, M., Rai, R., Paterson, C., Regan, L., 2002. Defective endovascular trophoblast invasion in primary antiphospholipid antibody syndrome-associated early pregnancy failure. Hum Reprod 17, 1067-1071.

Slater, M., Danieletto, S., Gidley-Baird, A., Teh, L.C., Barden, J.A., 2004a. Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X(7) receptors. Histopathology 44, 206-215.

Slater, M., Danieletto, S., Pooley, M., Teh, L.C., Gidley-Baird, A., Barden, J.A., 2004b. Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions. Breast Cancer Res Tr 83, 1-10.

Solini, A., Cuccato, S., Ferrari, D., Santini, E., Gulinelli, S., Callegari, M.G., Dardano, A., Faviana, P., Madec, S., Di Virgilio, F., Monzani, F., 2008. Increased P2X(7) receptor expression and function in thyroid papillary cancer: A new potential marker of the disease? Endocrinology 149, 389-396.

Solini, A., Menini, S., Rossi, C., Ricci, C., Santini, E., Blasetti Fantauzzi, C., Iacobini, C., Pugliese, G., 2013. The purinergic 2X7 receptor participates in renal inflammation and injury induced by high-fat diet: possible role of NLRP3 inflammasome activation. The Journal of pathology 231, 342-353.

Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A., Buell, G., 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). Science 272, 735-738.

Takai, E., Tsukimoto, M., Harada, H., Sawada, K., Moriyama, Y., Kojima, S., 2012. Autocrine regulation of TGF-beta 1-induced cell migration by exocytosis of ATP and activation of P2 receptors in human lung cancer cells. J Cell Sci 125, 5051-5060.

Tekpli, X., Huc, L., Sergent, O., Dendele, B., Dimanche-Boitrel, M.T., Holme, J.A., Lagadic-Gossmann, D., 2012. NHE-1 relocation outside cholesterol-rich membrane microdomains is associated with its benzo[a]pyrene-related apoptotic function. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology 29, 657-666.

Tekpli, X., Rissel, M., Huc, L., Catheline, D., Sergent, O., Rioux, V., Legrand, P., Holme, J.A., Dimanche-Boitrel, M.T., Lagadic-Gossmann, D., 2010. Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis. Toxicology and applied pharmacology 243, 68-76.

Tung, E.W., Philbrook, N.A., Belanger, C.L., Ansari, S., Winn, L.M., 2014. Benzo[a]pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: a possible mechanism for benzo[a]pyrene-induced toxicity. Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis 760, 64-69.

Umannova, L., Machala, M., Topinka, J., Schmuczerova, J., Krcmar, P., Neca, J., Sujanova, K., Kozubik, A., Vondracek, J., 2011. Benzo[a]pyrene and tumor necrosis factor-alpha coordinately increase genotoxic damage and the production of proinflammatory mediators in alveolar epithelial type II cells. Toxicology letters 206, 121-129.

Wood, A.W., Wislocki, P.G., Chang, R.L., Levin, W., Lu, A.Y., Yagi, J., Hernandez, O., Herina, D.M., Conney, A.H., 1976. Mutagenicity and cytotoxicity of benzo(a)pyrene benzo-ring epoxides. Cancer research 36, 3358-3366.

Zhang, L., Connor, E.E., Chegini, N., Shiverick, K.T., 1995. Modulation by benzo[a]pyrene of epidermal growth factor receptors, cell proliferation, and secretion of human chorionic gonadotropin in human placental cell lines. Biochemical pharmacology 50, 1171-1180.

Zhang, L., Shiverick, K.T., 1997. Benzo(a)pyrene, but not 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, alters cell proliferation and c-myc and growth factor expression in human placental choriocarcinoma JEG-3 cells. Biochemical and biophysical research communications 231, 117-120.

Zhang, W., Liu, N., Wang, X., Jin, X., Du, H., Peng, G., Xue, J., 2014. Benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide induced p53-independent necrosis via the mitochondria-associated pathway involving Bax and Bak activation. Human & experimental toxicology.

Zhou, B.B., Elledge, S.J., 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature 408, 433-439.

Zhu, W., Cromie, M.M., Cai, Q., Lv, T., Singh, K., Gao, W., 2014. Curcumin and vitamin E protect against adverse effects of benzo[a]pyrene in lung epithelial cells. PloS one 9, e92992.

FIGURES

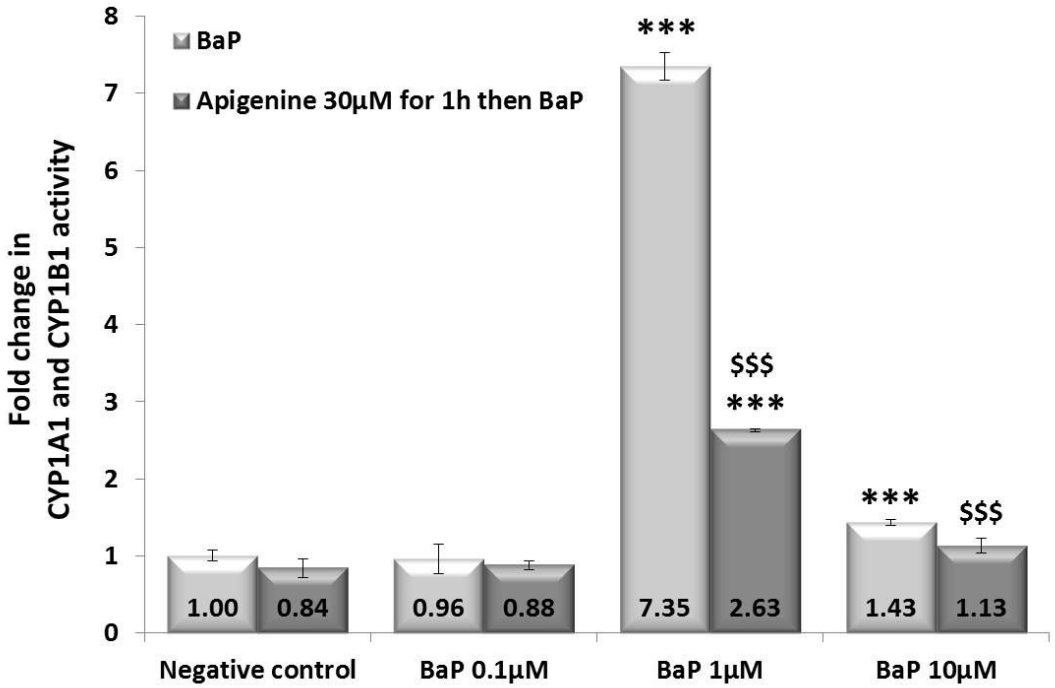


Figure 1: **CYP1A1 and CYP1B1 activity evaluated using 7-EROD probe**. Cells were incubated with BaP for 72 h or apigenin (CYP1A1 and CYP1B1 inhibitor) for 30 min prior to BaP incubation. *** $p < 0.001$ compared to negative control, $$$ $p < 0.001$ compared to BaP.

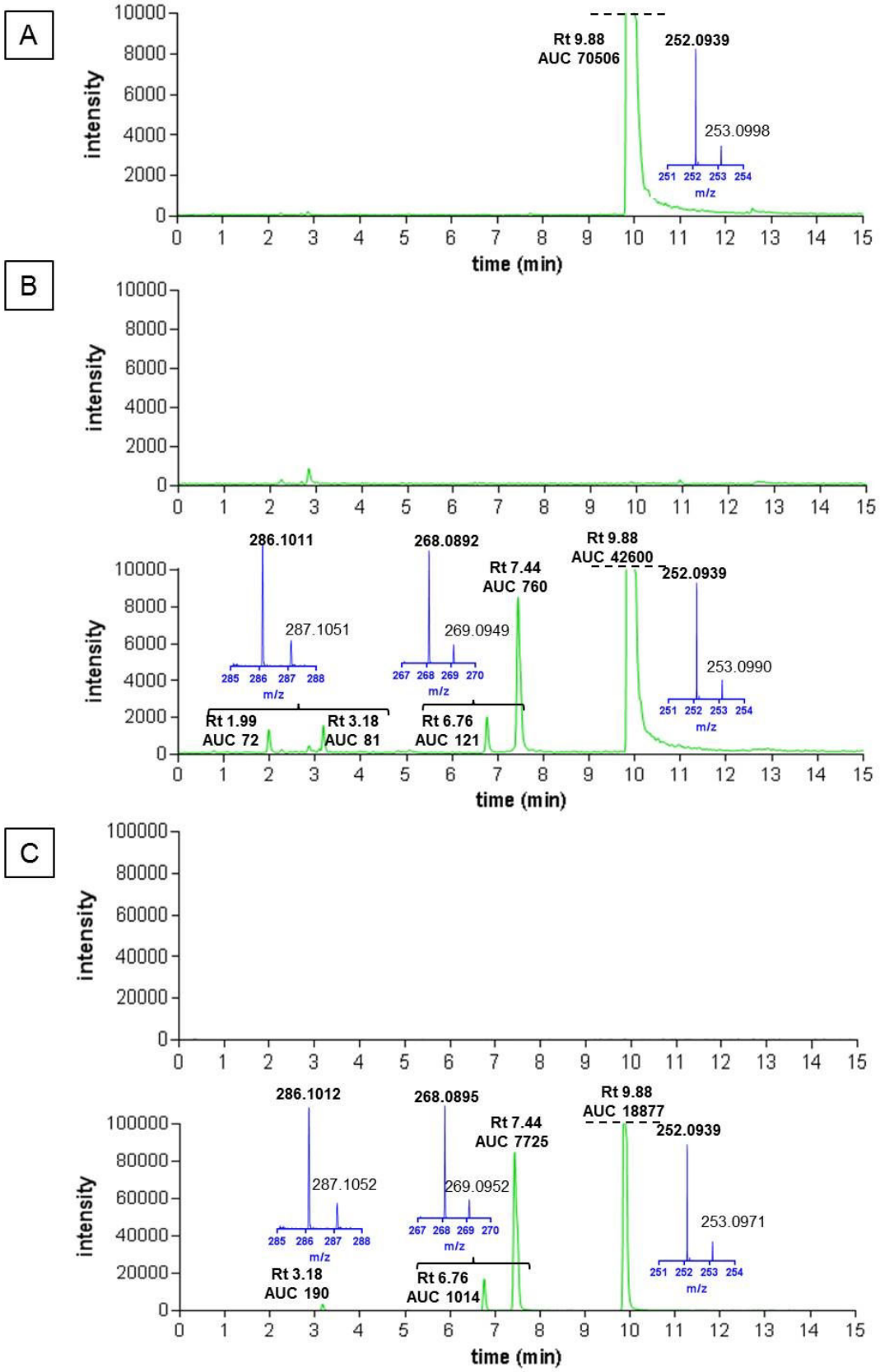


Figure 2: **Detection of BaP and its metabolites by mass spectrometry in Jeg-3 cells and cell supernatants**. Reconstructed ion chromatogram (green lines) at *m/z* values of the BaP $M^{+\bullet}$

ion and its oxidized metabolites detected as $M^{+\bullet}$ ions for cell-free culture medium (A), cell culture supernatants (B) and cell pellets (C). Insets are displayed mass spectra of BaP and metabolites actually detected (blue lines). Areas under the curve (AUC) are representative of the concentrations of molecules in samples.

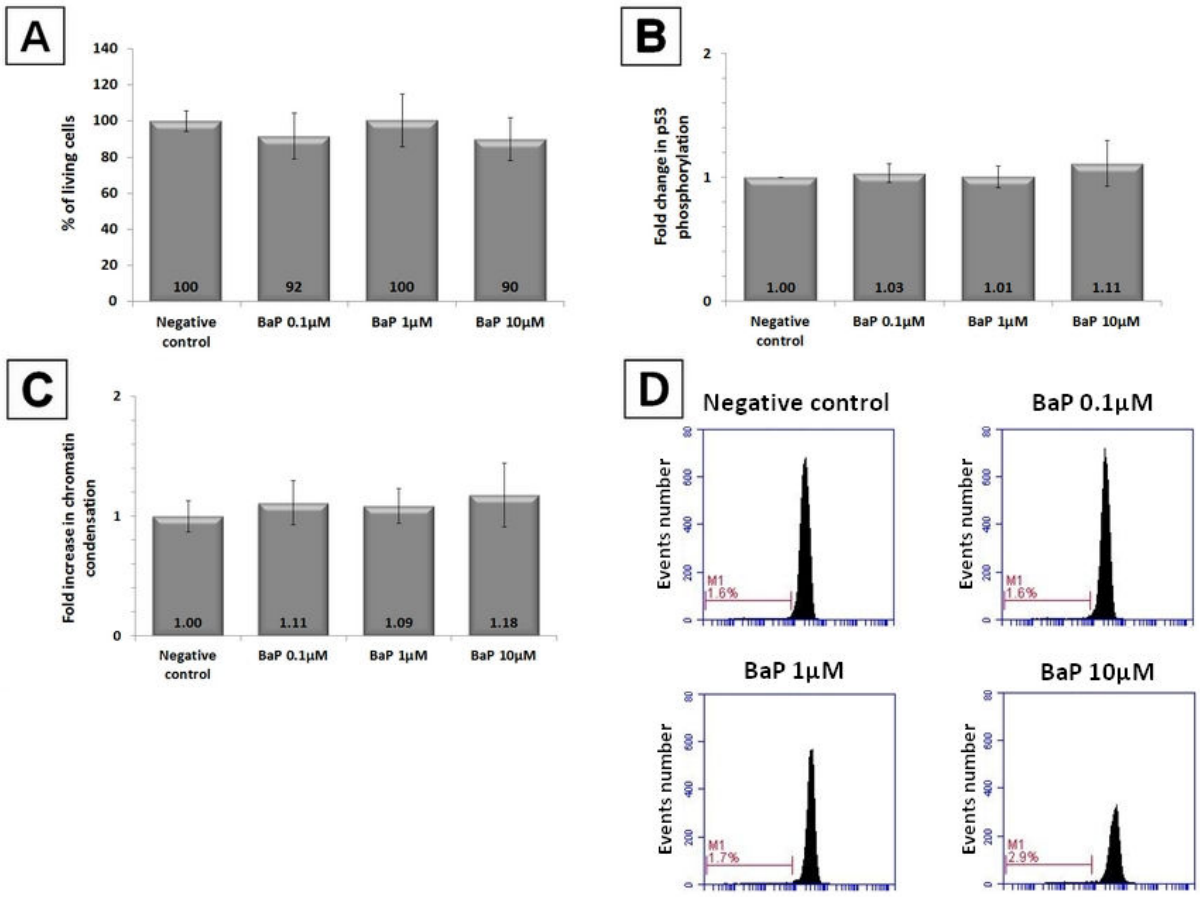


Figure 3: **Cell viability and apoptosis evaluation after BaP incubation**. (A) Cell viability using neutral red uptake on living cells after BaP incubation for 72 h. (B) p53 phosphorylation on serine 46 level after BaP incubation for 72 h. The cells were harvested, nuclear extracts were collected then phosphorylated p53 and total p53 levels were evaluated by ELISA. Phosphorylated p53 level was normalized by total p53 level. (C) Chromatin condensation evaluated by Nuclear ID assay on living cells after BaP incubation for 72 h. (D) DNA fragmentation (SubG1 peak) evaluated by flow cytometry after BaP incubation for 72 h. The cells were harvested, fixed and permeabilized then DNA was stained using propidium iodide. DNA content was then analyzed on flow cytometry.

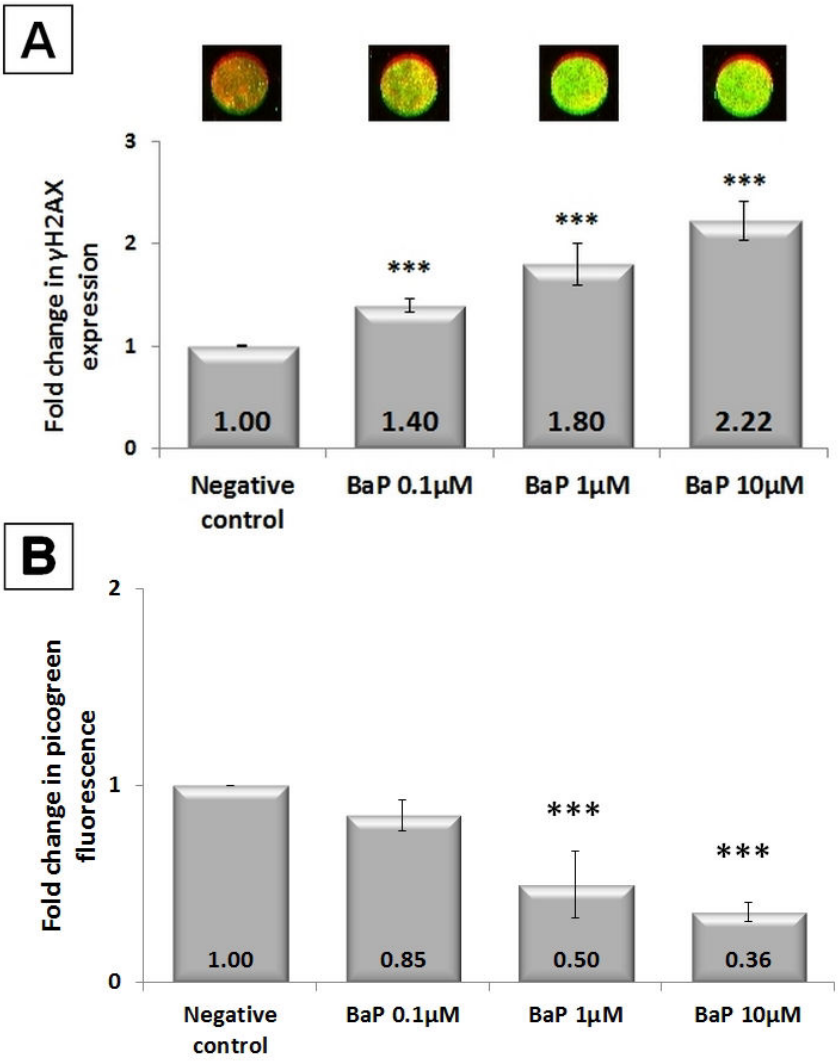


Figure 4: **BaP-induced genotoxicity**. (A) γH2AX expression on In Cell Western after BaP incubation for 72 h. The cells were fixed and permeabilized before γH2AX immunostaining. (B) DNA double-strand content after BaP incubation for 72 h. The cells were lysed and DNA was labelled using picogreen probe. Fluorescent signal was then read on a microplate cytometer.

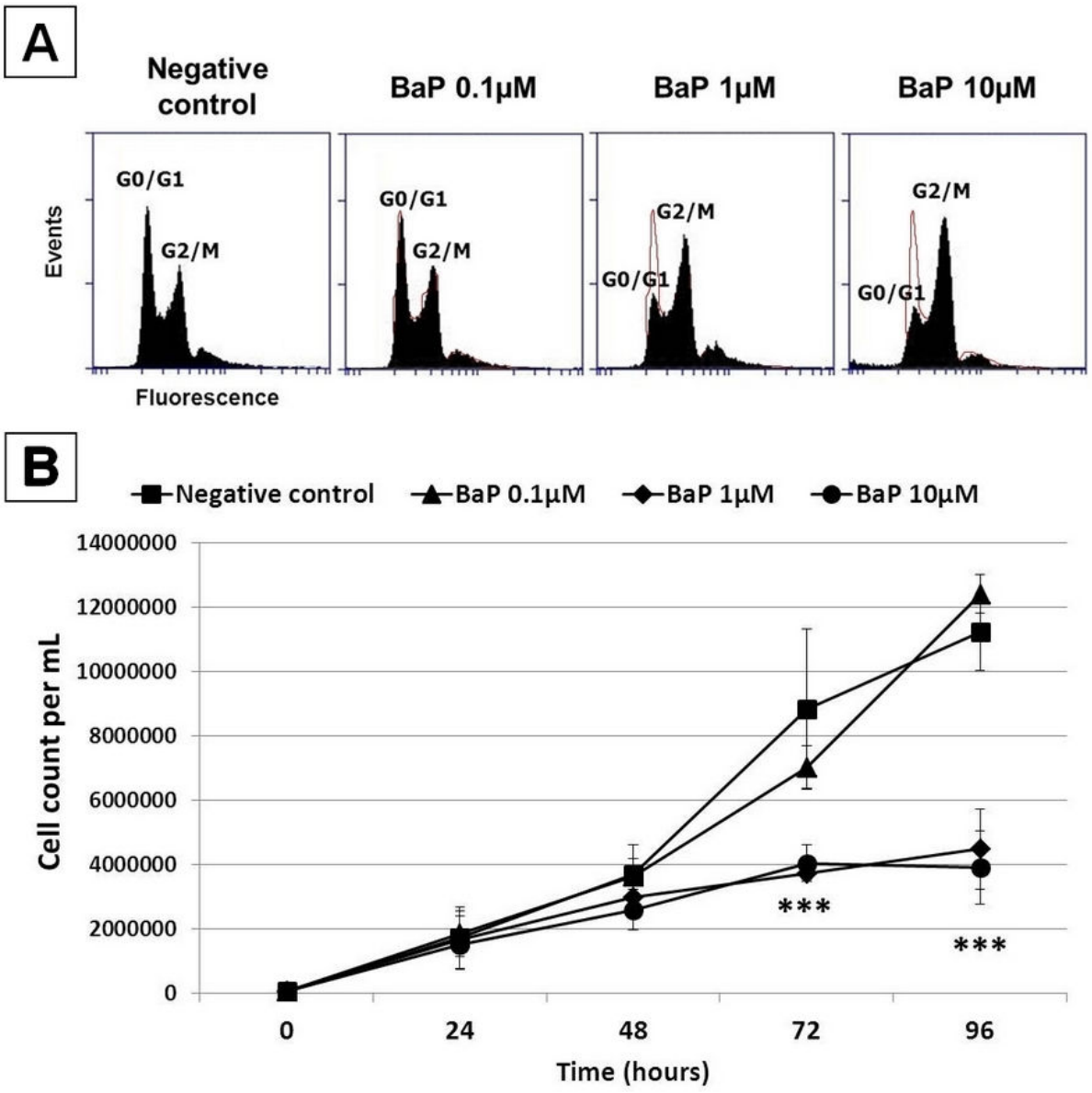


Figure 5: (A) **Cell cycle** analysis by flow cytometry after BaP incubation for 72 h. The cells were harvested, fixed and permeabilized then DNA was stained using propidium iodide. (B) **Cell proliferation** under BaP incubation. Cell density was evaluated by cell counting each day for 4 days. *** $p < 0.001$ compared to negative control.

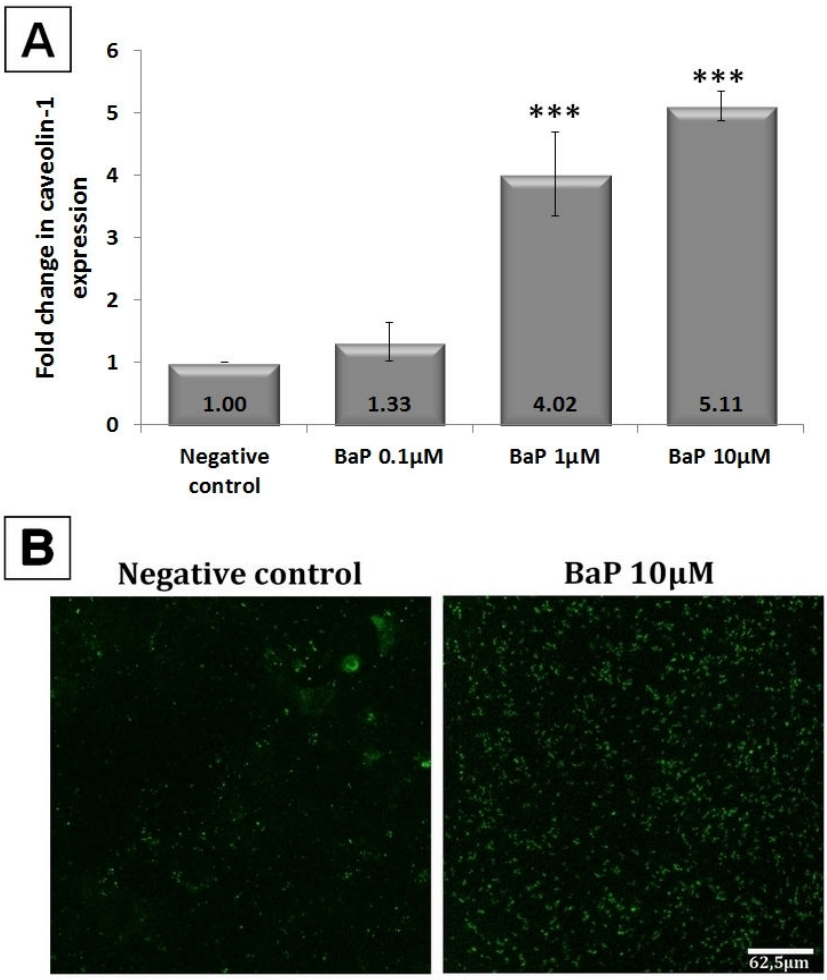


Figure 6: (A) **Caveolin-1** expression by flow cytometry after 72 h BaP incubation. The cells were harvested and fixed, and then caveolin-1 was immunostained. *** $p < 0.001$ compared to negative control. (B) **Phosphatidylserines externalization** observed under confocal microscopy after BaP incubation for 72 h. The cells were fixed then phosphatidylserines in outer plasma membrane were labelled using annexin V.

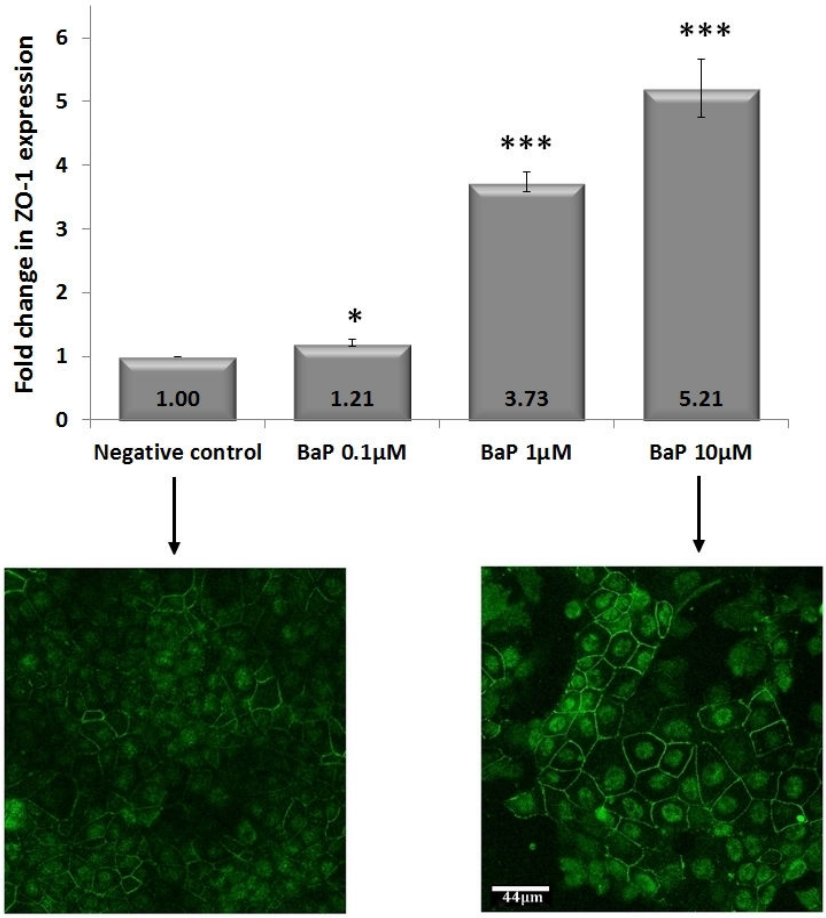


Figure 7: **ZO-1 expression** by flow cytometry (top panel) and confocal microscopy (bottom panel) after BaP incubation for 72 h. The cells were fixed and permeabilized before ZO-1 immunostaining. * $p < 0,01$; *** $p < 0.001$ compared to negative control.

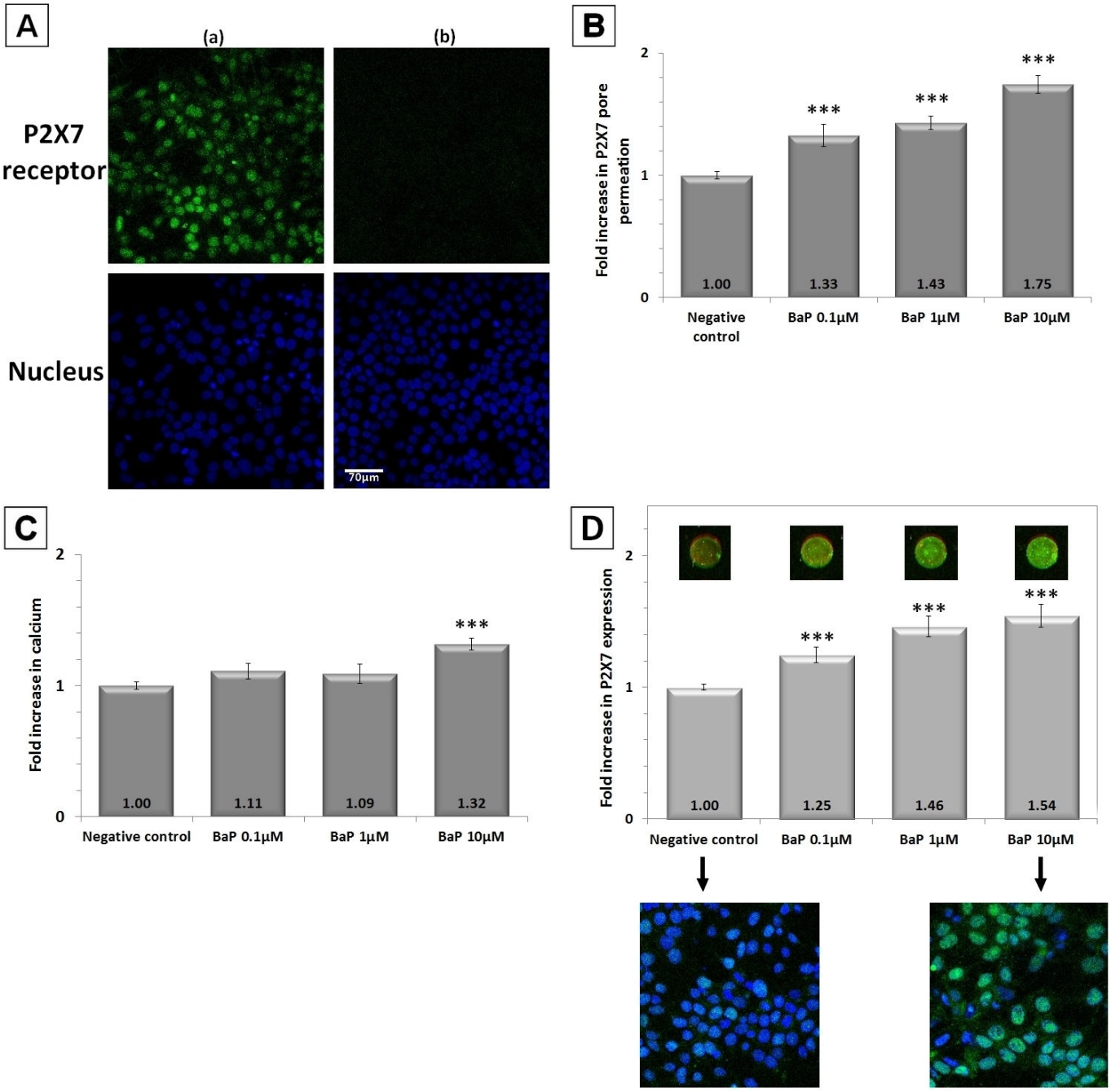


Figure 8: **P2X7 receptor expression and activation after BaP incubation.** (A) P2X7 receptor expression by confocal microscopy. The cells were fixed, permeabilized then labelled with primary and secondary antibodies (a) or secondary antibody alone as isotype control (b). Nuclei were labelled with TO-PRO-3. (B) P2X7 pore permeation using YO-PRO-1 probe on living cells after BaP incubation for 72 h. *** $p < 0.001$ compared to negative

control. (C) Calcium dosage using Fluo-4 assay on living cells after BaP incubation for 72 h. *** $p < 0.001$ compared to negative control. (D) P2X7 expression by In Cell Western (top panel) and confocal microscopy (bottom panel) after BaP incubation for 72 h. The cells were fixed and permeabilized before P2X7 immunostaining. On top, pictures represent the merge of TO-PRO-3 fluorescence (DNA content in red) and P2X7 infrared antibody (green), and histogram represents the infrared P2X7 antibody / TO-PRO-3 ratio calculated in arbitrary units. On bottom, confocal microscopy pictures represent the merge of TO-PRO-3 fluorescence (blue) and P2X7 antibody (green) in negative control (left) and in BaP 10 µM (right).

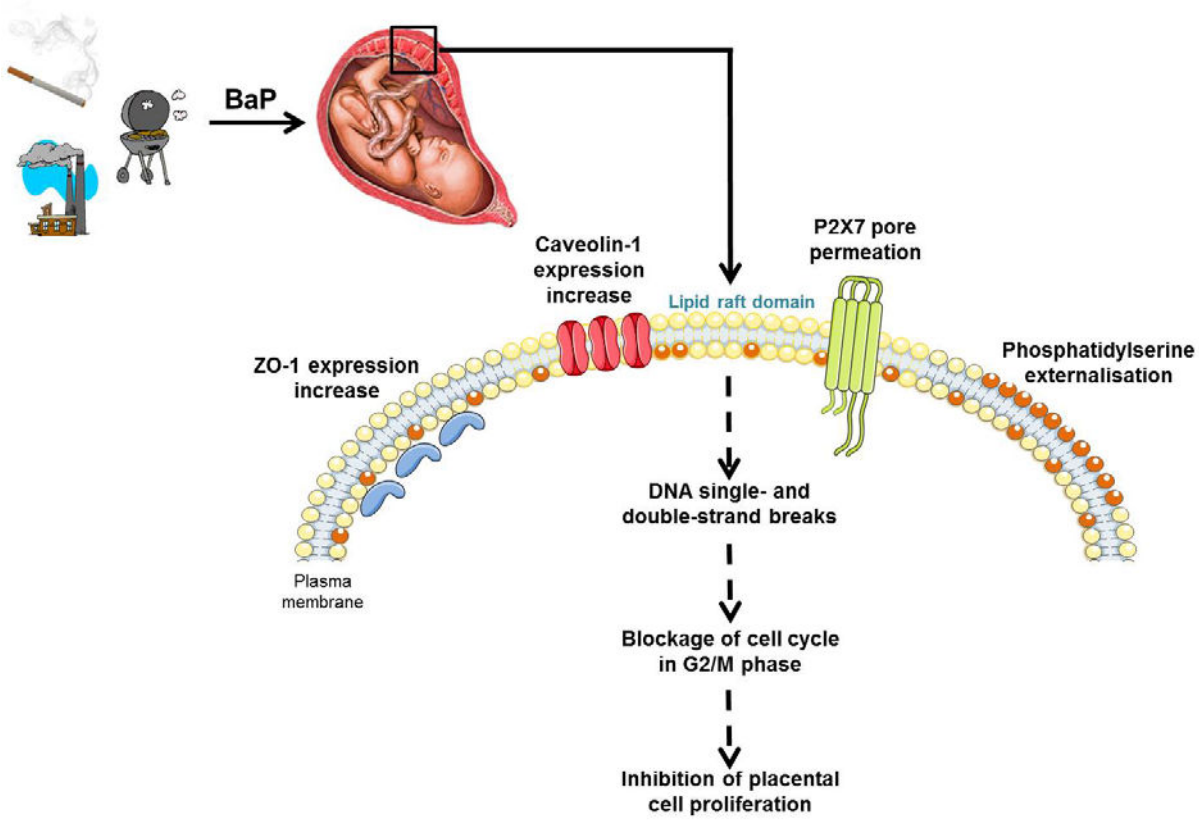


Figure 9: **Graphical abstract**

Annexe B. Article 2

Soumis dans la revue Nutrition & Metabolism

Anaïs WAKX, Mélody DUTOT, France MASSICOT, Patrice RAT

Amyloid β peptide induces apoptosis through P2X7 cell death receptor in retinal cells: modulation by marine omega-3 fatty acid DHA and EPA

Amyloid β peptide induces apoptosis through P2X7 cell death receptor in retinal cells: modulation by marine omega-3 fatty acid DHA and EPA

Anaïs Wakx [a], Mélody Dutot [a, b], France Massicot [a] and Patrice Rat [a]

(a) UMR CNRS 8638 - Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

(b) Yslab, 2 rue Félix Le Dantec, 29000 Quimper, France

Keywords: Age-related macular degeneration, P2X7 receptor, amyloid-β peptide, retinal cells, apoptosis, DHA, EPA, omega-3 fatty acid.

Corresponding author: Patrice Rat, UMR CNRS 8638 - Laboratoire de Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France; Tel: +33 1 53 73 98 21; Fax: +33 1 43 26 71 22; E-mail: patrice.rat@parisdescartes.fr

ABSTRACT

Background: Retinal Müller glial cells are responsible for maintaining retinal homeostasis and their alterations under pathological conditions can contribute to retinal degeneration. Age-related macular degeneration (AMD) is characterized by accumulation of extracellular deposits called drusen in which amyloid β peptide (Aβ) is a key constituent. Aβ is commonly associated with senile plaques in Alzheimer's disease (AD). P2X7 cell death receptor has been found to be involved in AD pathogenesis, we so investigated the P2X7-dependent cell-death pathway induced by Aβ on Müller cells.

Methods: retinal Müller glial cells were incubated with Aβ for 48h. Cell viability was assessed using Alamar blue assay and cytotoxicity using lactate dehydrogenase release assay. P2X7 receptor expression was highlighted by immunolabelling observed on confocal microscopy and its activation was evaluated by YO-PRO-1 assay. Hoechst 33342 was used to evaluate chromatin condensation and caspase 8 and 3 activation was assessed using AMC assays. Lipid formulation rich in EPA and DHA used to modulated Aβ cytotoxicity were incubated on cells for 15 minutes prior Aβ incubation

Results: For the first time, we showed that Aβ induced caspase-independent apoptosis through P2X7 receptor activation on our retinal model. Docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) are poly unsaturated fatty acids recommended in food supplement to prevent AMD. We so modulated Aβ cytotoxicity using a lipid formulation rich in DHA and EPA to have a better understanding of the results observed in clinical studies

Conclusions: We showed that fish oil rich in EPA and DHA, in combination with a potent P2X7 receptor antagonist, represent an efficient modulator of Aβ toxicity and that P2X7 could be an interesting therapeutic target to prevent AMD.

INTRODUCTION

Age-related Macular Degeneration (AMD) is a progressive degeneration of the macula, the portion of the retina used for central vision. It is the leading cause of irreversible loss of vision in those over 50 years in the Western industrialized world [1]. The United Nations estimates the number of people with AMD at 20-25 million worldwide [2]. As AMD progresses, it can develop into two distinct forms of late or advanced AMD: “dry” AMD (geographic atrophy, 90%) and “wet” AMD (neovascular AMD, 10%). Early stage of AMD is characterized by the formation of drusen that are deposits of extracellular material located underneath the retinal pigmented epithelium (RPE). Drusen provokes an inflammatory response and are associated with RPE atrophy. Photoreceptors overlying drusen died by apoptosis, whereas retinal Müller glial cells are activated. Under physiological conditions, Müller cells are responsible for maintaining its homeostasis, support neuronal activity and participate in the induction, maintenance and proper functioning of the blood-retinal barrier [3-5]. Alterations of Müller cells under pathological conditions can contribute to retinal degeneration [6-8]. There is no curative treatment against atrophic AMD, which affects 90% of AMD patients. Indeed, consumption of micronutrients, such as zinc, β-carotene or vitamins, has been shown to prevent AMD progression. A study reviewing the role of dietary omega-3 long chain poly-unsaturated fatty acid (PUFA) in the prevention of AMD, reported a 38% reduced rate of progression to late AMD [9]. DHA (docosahexaenoic acid, C22:6 ω-3) and its precursor EPA (eicosapentaenoic acid, C20:5 ω-3) are the major structural long chain PUFA of the membrane of photoreceptors [10]. DHA is essential for the biogenesis and the function of photoreceptors [11]. Moreover, EPA and DHA have antioxidant, anti-inflammatory, antiapoptotic and antiangiogenic roles in retina [12, 13]. PUFA content in the

retina decreases with aging and it potentially induces a dysfunction of retinal cells. Participants who reported the highest levels of EPA consumption had a reduced likelihood of AMD progression [14]. Amyloid β peptide (Aβ) is a key constituent of drusen [15-17]. It has been suggested that drusen could correspond to the transposition of senile plaques in Alzheimer's disease (AD). In the retina of mice models of AD, an age-dependent Aβ accumulation has been detected, possibly resulting in neurodegeneration [18]. It has been found that oligomerized Aβ is more toxic than non-oligomerized Aβ in retinal cell cultures [19, 20]. Retinal toxicity seems to be associated with oxidative stress and pro-inflammatory response but underlying mechanisms remain not clearly defined [21, 22]. The purinergic receptor P2X7 is an ATP-gated cationic channel expressed by virtually all types of cells [23, 24]. P2X7 is involved in oxidative stress, cell death and inflammatory processes, all of which have been linked to AMD [25, 26]. Moreover, a recent genetic study has demonstrated that a haplotype containing a rare genetic variant of P2X7 receptor is associated with increased susceptibility to AMD [27].The aim of our study was first to describe the P2X7-dependent cell-death pathway induced by Aβ on Müller cells, then to modulate Aβ cytotoxicity using a lipid formulation rich in DHA and EPA.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Reagents for cell culture were provided by Eurobio (Les Ulis, France), flasks and microplates from Corning (Schiphol-Rijk, The Netherlands), chamber slides from Nunc-Thermo Fisher Scientific (Rochester, NY, USA). Lipid formulation rich in DHA and EPA was provided by Yslab (Quimper, France). BBG, a specific P2X7 receptor inhibitor [28], was

purchased from Bio-Rad (Richmond, California). Hoechst 33342, YO-PRO-1, TO-PRO-3 and secondary antibodies were purchased from Invitrogen (Poort Gebouw, The Netherlands). Aβ (Bachem, Weil am Rhein, Germany) was oligomerized as previously described [29]. Primary antibodies were provided from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). All other chemicals, dyes and kits were provided from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Cell culture

The experiments were performed using the immortalized and well established human Müller cell line MIO-M1 [30]. MIO-M1 were cultured using Dulbecco's Modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml penicillin and 50 IU/ml streptomycin, at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 as previously described [31]. Confluent cultures in flasks were removed by trypsin incubation, and then the cells were seeded into 96-well (20,000 cells per well) or 24-well (38,000 cells per well) culture microplates and kept at 37°C for 24h.

Incubation protocols

Whenever the cells reached confluency, culture medium was removed and the cells were incubated with oligomerized Aβ (25µM in 2.5% FBS medium for 48h) or HNE (2, 10, 20 or 50µM, for 6h, 24h or 48h) at 37°C.

Neat fish oil containing EPA and DHA (see composition in Table 1) was incubated for 15 minutes followed by 24 hours in culture medium prior to Aβ incubation [32-34]. Brilliant Blue G (BBG) (25µM, according to Kawahara [35]) was incubated with cells for 15 minutes prior to Aβ incubation. BBG is a potent inhibitor of P2X7 receptor since concentrations as low as 25µM are enough to inhibit receptor activation.

Cell viability (necrosis assessment): Alamar blue assay

The Alamar Blue® assay uses resazurin, a blue fluorogen probe, which is reduced to a red fluorescent compound (resorufin) by intracellular redox enzymes [36]. A solution of resazurin at 0.1mg/mL was prepared in PBS then diluted to the eleventh in culture medium supplemented with 2.5% FBS. The cells were exposed to resazurin solution for 6 hours at 37°C, then the fluorescence signal was read (λexc = 535nm, λem = 600nm, Safire; Tecan®, Zurich, Switzerland).

Cytotoxicity: Lactate dehydrogenase (LDH) release assay

The LDH assay measures membrane integrity as a function of the amount of cytoplasmic LDH released into the medium [37]. Briefly, cell supernatants were incubated with the LDH mixture containing NAD as LDH substrate and a tetrazolium dye (the mixture was prepared according to manufacturer's instructions for Sigma kit TOX7) for 30 minutes. Absorbance was detected at 490 nm (Safire; Tecan®, Zurich, Switzerland).

P2X7 expression by immunofluorescence using confocal microscopy

After seeding in chamber slides for 24h, the cells were fixed with 2% paraformaldehyde and 2mM calcium for 15 min at room temperature. The cells were then permeabilized with 0.2% triton X-100 for 5 min. First, the cells were incubated with primary antibody (rabbit anti-P2X7 at 5µg/mL) in a solution of PBS-1% BSA or in PBS-1% BSA by omitting primary antibody (isotypic control) for 1h, and second, the cells were incubated with secondary antibody (Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG) in PBS-1% BSA for 1h away from light. Third, nuclei were stained with TO-PRO-3 at 2µg/µL for 10 min. Slides were then observed under a Leica

TCS SP2 confocal microscope (Leica Microsystems) equipped with a x40 oil-immersion objective. Staining specificity was carefully checked by omitting primary antibody.

Confocal imaging was performed at IFR71-IMTCE Cellular and Molecular Imaging platform (Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Paris, France).

P2X7 activation: YO-PRO-1 test

YO-PRO-1, a fluorogenic probe, enters cells through P2X7 receptor activation-induced pores and emits fluorescence when it binds DNA [38]. A 2µM YO-PRO-1 solution in PBS was distributed in wells and the microplate was placed at room temperature away from light for 10 minutes [39-43]. The fluorescence signal was then scanned (λexc = 491nm, λem = 509nm, Safire; Tecan®, Zurich, Switzerland).

Chromatin condensation: Hoechst 33342 assay

Hoechst 33342 dye is used to detect chromatin condensation in cells simultaneously with propidium iodide [41]. Hoechst 33342 enters living and apoptotic cells whereas propidium iodide enters necrotic cells faster than Hoechst 33342. A solution of Hoechst 33342 at 10mg/mL and propidium iodide at 0.5mg/mL was prepared in PBS. Cells were exposed for 30 minutes at 37°C then the fluorescence was read (λexc = 365nm, λem = 450nm, Safire; Tecan®, Zurich, Switzerland).

Caspases 3 and 8 activation: AMC assays

The caspases 3 and 8 fluorometric assays were realized following the procedure for fluorometric assay of caspases 3 and 8 activity in adherent cell lines of the CASP3F and CASP8F Sigma kits. Briefly, the cells were treated with lysis buffer and incubated on ice for

20 min. Then, DEVD-AMC for caspase 3 detection or IETD-AMC for caspase 8 detection was added in each well. The samples were incubated in the dark at room temperature for 30 minutes. Afterward, the fluorescence signal was read (λexc = 360 nm, λem = 460 nm, Safire; Tecan®, Zurich, Switzerland).

Results exploitation and statistical analysis

All data for microtitration were obtained in fluorescence or absorbance units and expressed as a percentage of the negative control (culture medium). Each point was tested in three different wells and experiments were reproduced in triplicate. Data are expressed as means ± standard deviation. The mean values for each test were analyzed by one-way ANOVA followed by the Dunnett test (Sigma Stat 2.0; Chicago, Illinois, USA) and the level of significance was fixed at 0.05.

RESULTS

First, we investigated cell viability in Aβ-treated MIO-M1 cells. No significant difference in cell viability was observed between Aβ-treated MIO-M1 and negative control MIO-M1, when tested by the Alamar Blue assay (Fig. 1A). No significant change in the plasma membrane integrity was detected in Aβ-treated MIO-M1 in comparison to negative control, when tested by LDH activity (Fig. 1B).

Fig. 2 shows a strong labeling of MIO-M1 cell membranes using a specific anti-P2X7 antibody (Fig. 2A right) compared to isotype control antibody (Fig. 2A left).

Then, we analyzed P2X7 pore formation by the YO-PRO-1 assay. Fluorescence signal significantly increased (x3.16, $p<0.001$) when MIO-M1 were incubated with Aβ compared to

negative control (Fig. 2B). When the Aβ-treated MIO-M1 were preincubated with the P2X7 inhibitor, BBG, the fluorescence signal significantly decreased (x0.48, $p<0.001$) compared to Aβ-treated MIO-M1 without pre-incubation, confirming activation of P2X7 by Aβ.We also observed that a specific P2X7 receptor activator, BzATP, increased P2X7 pore formation, which confirms the specificity of the YO-PRO-1 assay to evaluate P2X7 activation. We also studied chromatin condensation, an irreversible early phase of apoptosis assessed by the Hoechst 33342 assay because even no loss of cell viability at 48h doesn't mean no apoptosis at 48h. In Figure 3, Hoechst 33342 fluorescence was significantly increased (x2.11, $p<0.001$) in Aβ-treated MIO-M1 compared to negative control. Preincubation of Aβ-treated MIO-M1 with BBG totally inhibited chromatin condensation compared to Aβ-treated MIO-M1 without preincubation increased (x0.53, $p<0.001$), indicating the central role of P2X7 in the mediation of Aβ-induced condensation of Müller cell chromatin. Finally, we evaluated caspase activation. We focused our attention on caspase 8 and caspase 3. No significant difference was observed between Aβ-treated MIO-M1 compared to negative control (Fig.4A and 4B).

Altogether, these data indicated that Aβ first alters chromatin state of Müller cells without inducing cell death at 48h.

EPA and DHA have antioxidant and antiapoptotic roles in retina, but their protective effects on Müller cells against Aβ remains undetermined. P2X7 pore formation was significantly decreased (x0.77, $p<0.001$) when Aβ-treated MIO-M1 were pre-incubated with EPA-DHA fish oil compared to Aβ alone, but the signal remains significantly higher than in negative control (Fig. 5A), suggesting that P2X7 receptor is a target for protective effects of EPA and DHA in Aβ-treated Müller cells. Preincubation of MIO-M1 with both EPA-DHA fish

oil and BBG totally inhibited P2X7 pore formation (x0.33, $p<0.001$), meaning that BBG and EPA-DHA fish oil act synergically. Analysis of chromatin condensation, an irreversible early phase of apoptosis assessed by the Hoechst 33342 assay showed a significant decrease (x0.78, $p<0.001$) in Hoechst 33342 signal when the Aβ-treated MIO-M1 were pre-incubated with EPA-DHA fish oil compared to Aβ-treated MIO-M1 without pre-incubation (Fig.5B). Preincubation of Aβ-treated MIO-M1 with both EPA-DHA fish oil and BBG totally inhibited chromatin condensation compared to Aβ-treated MIO-M1 with or witout pre-incubation with EPA-DHA fish oil (x0.42, $p<0.001$), confirming the P2X7 receptor-mediated deleterious effects of Aβ and the potential protective role of EPA-DHA against these effects in Müller cells.

DISCUSSION

Müller cells have been showed to be implicated in AMD [44, 45] and selective ablation of these cells led to photoreceptor apoptosis, blood–retinal barrier breakdown and retinal neovascularization [46]. We report that oligomerized Aβ induces apoptosis rather than necrosis on human retinal Müller cells (MIO-M1). P2X7 receptor is involved in oxidative stress, cell death and inflammatory processes, all of which have been linked to AMD. Aβ-induced apoptosis appears to be P2X7 cell death receptor-dependent and caspase-independent but further investigations are needed to confirm that. We showed for the first time that P2X7 receptor activation plays a pivotal role in Aβ-induced apoptosis in Müller cells. Indeed, P2X7 receptor inhibition using a specific antagonist (BBG) drastically decreased Aβ-induced apoptosis. Our results are in accordance with previous results that showed that P2X7 receptor blockade prevents photoreceptor cell apoptosis and confers neuroprotection

in a rat model of Alzheimer's disease brain [47, 48]. However, the mechanism by which BBG acts remains to be deeper studied. In our model, P2X7 activation was not associated with extrinsic caspase 8 activation, as previously described [49, 50]. Caspase 3, which is involved both in the extrinsic and the intrinsic pathways, was not activated in our model, meaning that Aβ peptide induces P2X7 activation leading to caspase-independent chromatin condensation in Müller cells.

AREDS2 results showed that addition of DHA and EPA to AREDS formulation as ethyl esters did not further reduce risk of progression to advanced AMD. In our model, EPA and DHA as triglycerides in fish oil had preventive effects towards P2X7 cell death receptor-dependent apoptosis induced by Aβ. P2X7 receptors are present in caveolae [51-54] that are low fluidity membrane lipid rafts domains [55]. We previously showed that the same EPA-DHA formulation that we used here increased caveolin-1 expression and incorporated into retinal cell membranes [56], which can increase membrane fluidity, as described by Yang et al. [57]. Therefore, the EPA-DHA fish oil we used can lead to P2X7 cell death receptor blockade through lipid raft disruption.

EPA (20:5 ω-3) is the omega-3 homologue of arachidonic acid (20:4 ω-6), which is at the origin of pro-inflammatory mediators (prostaglandin E2). On the contrary, EPA is at the origin of anti-inflammatory mediators (prostaglandin E3) after metabolism by COX enzymes [58]. As we observed in a previous study, an increase in EPA can lead to a decrease in arachidonic acid in cell membranes and then to a decrease in the pro-inflammatory response [32]. The high content of EPA in our fish oil formulation could help diminishing the inflammation associated to AMD. Fish EPA-DHA and BBG exerted synergic effects in the prevention of Aβ damages in our model. As the potential application of BBG as a

neuroprotective therapy has already been suggested [47], the mixture of fish EPA-DHA and BBG opens further new strategic therapeutics.

CONCLUSION

For the first time, our study showed that Aβ seems to induce caspase-independent apoptosis through P2X7 receptor activation in human retinal cells. We showed that marine lipid formulation containing EPA and DHA as triglycerides, in combination with BBG, a specific P2X7 receptor inhibitor, fully prevented Aβ cytotoxic effects in our model. So, marine oils rich in EPA and DHA, in combination with a potent P2X7 receptor antagonist, represent a promising efficient modulator of Aβ toxicity.

1. Klein R, Peto T, Bird A, Vannewkirk MR: **The epidemiology of age-related macular degeneration.** *Am J Ophthalmol* 2004, **137:**486-495.
2. Chopdar A, Chakravarthy U, Verma D: **Age related macular degeneration.** *Brit Med J* 2003, **326:**485-488.
3. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A: **Muller cells in the healthy and diseased retina.** *Prog Retin Eye Res* 2006, **25:**397-424.
4. Distler C, Dreher Z: **Glia cells of the monkey retina .2. Muller cells.** *Vision Res* 1996, **36:**2381-2394.
5. Tout S, Chanling T, Hollander H, Stone J: **The Role of Muller Cells in the Formation of the Blood-Retinal Barrier.** *Neuroscience* 1993, **55:**291-301.
6. Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P, Bringmann A: **Muller cells as players in retinal degeneration and edema.** *Graef Arch Clin Exp* 2007, **245:**627-636.
7. Begum R, Powner MB, Hudson N, Hogg C, Jeffery G: **Treatment with 670 nm light up regulates cytochrome C oxidase expression and reduces inflammation in an age-related macular degeneration model.** *PloS one* 2013, **8:**e57828.
8. Marc RE, Jones BW, Watt CB, Vazquez-Chona F, Vaughan DK, Organisciak DT: **Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration.** *Mol Vis* 2008, **14:**782-806.
9. Chong EWT, Kreis AJ, Wong TY, Simpson JA, Guymer RH: **Dietary omega-3 fatty acid and fish intake in the primary prevention of age-related macular degeneration - A systematic review and meta-analysis.** *Arch Ophthalmol-Chic* 2008, **126:**826-833.

10. Fliesler SJ, Maude MB, Anderson RE: **Lipid-Composition of Photoreceptor-Membranes from Goldfish Retinas.** *Biochim Biophys Acta* 1983, **734:**144-152.
11. Scott BL, Bazan NG: **Membrane Docosahexaenoate Is Supplied to the Developing Brain and Retina by the Liver.** *P Natl Acad Sci USA* 1989, **86:**2903-2907.
12. Shimazawa M, Nakajimaa Y, Mashima Y, Hara H: **Docosahexaenoic acid (DHA) has neuroprotective effects against oxidative stress in retinal ganglion cells.** *Brain Res* 2009, **1251:**269-275.
13. German OL, Insua M, Gentili C, Rotstein NP, Politi LE: **Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway.** *J Neurochem* 2006, **98:**1507-1520.
14. SanGiovanni JP, Chew EY, Agron E, Clemons TE, Ferris FL, Gensler G, Lindblad AS, Milton RC, Seddon JM, Klein R, et al: **The relationship of dietary omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intake with incident age-related macular degeneration - AREDS report no. 23.** *Arch Ophthalmol-Chic* 2008, **126:**1274-1279.
15. Anderson DH, Talaga KC, Rivest AJ, Barron E, Hageman GS, Johnson LV: **Characterization of beta amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration.** *Exp Eye Res* 2004, **78:**243-256.
16. Dentchev T, Milam AH, Lee VMY, Trojanowski JQ, Dunaief JL: **Amyloid-beta is found in drusen from some age-related macular degeneration retinas, but not in drusen from normal retinas.** *Mol Vis* 2003, **9:**184-190.
17. Isas JM, Luibl V, Johnson LV, Kayed R, Wetzel R, Glabe CG, Langen R, Chen J: **Soluble and Mature Amyloid Fibrils in Drusen Deposits.** *Invest Ophth Vis Sci* 2010, **51:**1304-1310.
18. Ning A, Cui J, To E, Ashe KH, Matsubara J: **Amyloid-beta Deposits Lead to Retinal Degeneration in a Mouse Model of Alzheimer Disease.** *Invest Ophth Vis Sci* 2008, **49:**5136-5143.
19. Rat P, Waks A, Dutot M, De Moucheron B, Laprevote O, Warnet J: **Beta-Amyloid induces toxic degenerative pathways on human retinal cells with P2X7 cell death receptor activation: Role in Age-Related Macular Degeneration (AMD).** In *Toxicol Lett*; *Aug 28; Eurotox, Paris, France*. 2011: S240-S240.
20. Wakx A, Rat P, De Moucheron B, Dutot M, Laprévote O: **Evaluation and modulation of toxic degenerative pathways induced by beta-amyloid on retinal cells: role of P2X7 cell death receptor.** In *Alzheimer Association International Conference on Alzheimer Disease; Paris*. 2011
21. Bruban J, Glotin AL, Dinet V, Chalour N, Sennlaub F, Jonet L, An N, Faussat AM, Mascarelli F: **Amyloid-beta(1-42) alters structure and function of retinal pigmented epithelial cells.** *Aging Cell* 2009, **8:**162-177.
22. Kurji KH, Cui JZ, Lin T, Harriman D, Prasad SS, Kojic L, Matsubara JA: **Microarray Analysis Identifies Changes in Inflammatory Gene Expression in Response to Amyloid-beta Stimulation of Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells.** *Invest Ophth Vis Sci* 2010, **51:**1151-1163.
23. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G: **The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7).** *Science* 1996, **272:**735-738.
24. Guha S, Baltazar GC, Coffey EE, Tu LA, Lim JC, Beckel JM, Patel S, Eysteinsson T, Lu W, O'Brien-Jenkins A, et al: **Lysosomal alkalinization, lipid oxidation, and reduced**

phagosome clearance triggered by activation of the P2X7 receptor. *Faseb J* 2013, **27:**4500-4509.
25. Nussenblatt RB, Lee RW, Chew E, Wei L, Liu B, Sen HN, Dick AD, Ferris FL: **Immune responses in age-related macular degeneration and a possible long-term therapeutic strategy for prevention.** *Am J Ophthalmol* 2014, **158:**5-11 e12.
26. Parmeggiani F, Sorrentino FS, Romano MR, Costagliola C, Semeraro F, Incorvaia C, D'Angelo S, Perri P, De Nadai K, Bonomo Roversi E, et al: **Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration: an up-to-date on genetic landmarks.** *Mediators of inflammation* 2013, **2013:**435607.
27. Gu BJ, Baird PN, Vessey KA, Skarratt KK, Fletcher EL, Fuller SJ, Richardson AJ, Guymer RH, Wiley JS: **A rare functional haplotype of the P2RX4 and P2RX7 genes leads to loss of innate phagocytosis and confers increased risk of age-related macular degeneration.** *Faseb J* 2013, **27:**1479-1487.
28. Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A: **Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors.** *Molecular pharmacology* 2000, **58:**82-88.
29. Bruban J, Glotin AL, Dinet V, Chalour N, Sennlaub F, Jonet L, An N, Faussat AM, Mascarelli F: **Amyloid-beta(1-42) alters structure and function of retinal pigmented epithelial cells.** *Aging Cell* 2009, **8:**162-177.
30. Limb GA, Salt TE, Munro PMG, Moss SE, Khaw PT: **In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1).** *Invest Ophth Vis Sci* 2002, **43:**864-869.
31. Bull ND, Limb GA, Martin KR: **Human Muller stem cell (MIO-M1) transplantation in a rat model of glaucoma: survival, differentiation, and integration.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, **49:**3449-3456.
32. Dutot M, Liang H, Martin C, Rousseau D, Grynberg A, Warnet JM, Rat P: **Per os administered refined olive oil and marine PUFA-rich oils reach the cornea: possible role on oxidative stress through caveolin-1 modulation.** *Nutr Metab* 2009, **6**.
33. Dutot M, de la Tourrette V, Fagon R, Rat P: **New approach to modulate retinal cellular toxic effects of high glucose using marine epa and dha.** *Nutr Metab* 2011, **8**.
34. Said T, Dutot M, Christon R, Beaudeux JL, Martin C, Warnet JM, Rat P: **Benefits and side effects of different vegetable oil vectors on apoptosis, oxidative stress, and P2X7 cell death receptor activation.** *Invest Ophth Vis Sci* 2007, **48:**5000-5006.
35. Kawahara S, Hata Y, Miura M, Kita T, Sengoku A, Nakao S, Mochizuki Y, Enaida H, Ueno A, Hafezi-Moghadam A, Ishibashi T: **Intracellular events in retinal glial cells exposed to ICG and BBG.** *Invest Ophth Vis Sci* 2007, **48:**4426-4432.
36. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F: **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.** *Eur J Biochem* 2000, **267:**5421-5426.
37. Fischer AB: **Gentamicin as a Bactericidal Antibiotic in Tissue-Culture.** *Med Microbiol Immun* 1975, **161:**23-39.
38. Idziorek T, Estaquier J, De Bels F, Ameisen JC: **YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability.** *Journal of immunological methods* 1995, **185:**249-258.
39. Dutot M, Pouzaud F, Larosche I, Brignole-Baudouin F, Warnet JM, Rat P: **Fluoroquinolone eye drop-induced cytotoxicity: role of preservative in P2X7 cell death receptor activation and apoptosis.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006, **47:**2812-2819.

40. Pauloin T, Dutot M, Warnet JM, Rat P: **In vitro modulation of preservative toxicity: high molecular weight hyaluronan decreases apoptosis and oxidative stress induced by benzalkonium chloride.** *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2008, **34:**263-273.
41. Dutot M, Paillet H, Chaumeil C, Warnet JM, Rat P: **Severe ocular infections with contact lens: role of multipurpose solutions.** *Eye (Lond)* 2009, **23:**470-476.
42. Dutot M, Warnet JM, Baudouin C, Rat P: **Cytotoxicity of contact lens multipurpose solutions: role of oxidative stress, mitochondrial activity and P2X7 cell death receptor activation.** *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2008, **33:**138-145.
43. Dutot M, Liang H, Pauloin T, Brignole-Baudouin F, Baudouin C, Warnet JM, Rat P: **Effects of toxic cellular stresses and divalent cations on the human P2X7 cell death receptor.** *Mol Vis* 2008, **14:**889-897.
44. Vessey KA, Greferath U, Jobling AI, Phipps JA, Ho T, Waugh M, Fletcher EL: **Ccl2/Cx3cr1 knockout mice have inner retinal dysfunction but are not an accelerated model of AMD.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012, **53:**7833-7846.
45. Cuenca N, Fernandez-Sanchez L, Campello L, Maneu V, De la Villa P, Lax P, Pinilla I: **Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases.** *Prog Retin Eye Res* 2014.
46. Shen W, Lee SR, Araujo J, Chung SH, Zhu L, Gillies MC: **Effect of glucocorticoids on neuronal and vascular pathology in a transgenic model of selective Muller cell ablation.** *Glia* 2014, **62:**1110-1124.
47. Notomi S, Hisatomi T, Murakami Y, Terasaki H, Sonoda S, Asato R, Takeda A, Ikeda Y, Enaida H, Sakamoto T, Ishibashi T: **Dynamic increase in extracellular ATP accelerates photoreceptor cell apoptosis via ligation of P2RX7 in subretinal hemorrhage.** *PloS one* 2013, **8:**e53338.
48. Ryu JK, McLarnon JG: **Block of purinergic P2X(7) receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease.** *Neuroreport* 2008, **19:**1715-1719.
49. Wang Q, Wang L, Feng YH, Li X, Zeng R, Gorodeski GI: **P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells.** *American journal of physiology Cell physiology* 2004, **287:**C1349-1358.
50. Fu W, McCormick T, Qi X, Luo L, Zhou L, Li X, Wang BC, Gibbons HE, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI: **Activation of P2X(7)-mediated apoptosis Inhibits DMBA/TPA-induced formation of skin papillomas and cancer in mice.** *BMC cancer* 2009, **9:**114.
51. Barth K, Weinhold K, Guenther A, Linge A, Gereke M, Kasper M: **Characterization of the molecular interaction between caveolin-1 and the P2X receptors 4 and 7 in E10 mouse lung alveolar epithelial cells.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2008, **40:**2230-2239.
52. Barth K, Weinhold K, Guenther A, Young MT, Schnittler H, Kasper M: **Caveolin-1 influences P2X7 receptor expression and localization in mouse lung alveolar epithelial cells.** *The FEBS journal* 2007, **274:**3021-3033.
53. Garcia-Marcos M, Perez-Andres E, Tandel S, Fontanils U, Kumps A, Kabre E, Gomez-Munoz A, Marino A, Dehaye JP, Pochet S: **Coupling of two pools of P2X7 receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland.** *Journal of lipid research* 2006, **47:**705-714.

54. Bannas P, Adriouch S, Kahl S, Braasch F, Haag F, Koch-Nolte F: **Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts.** *Blood* 2005, **105:**3663-3670.
55. Subczynski WK, Kusumi A: **Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1610:**231-243.
56. Dutot M, de la Tourrette V, Fagon R, Rat P: **New approach to modulate retinal cellular toxic effects of high glucose using marine epa and dha.** *Nutr Metab (Lond)* 2011, **8:**39.
57. Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JC: **Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing.** *Neurochemistry international* 2011, **58:**321-329.
58. Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST: **Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion.** *P Natl Acad Sci USA* 2003, **100:**1751-1756.

FIGURES

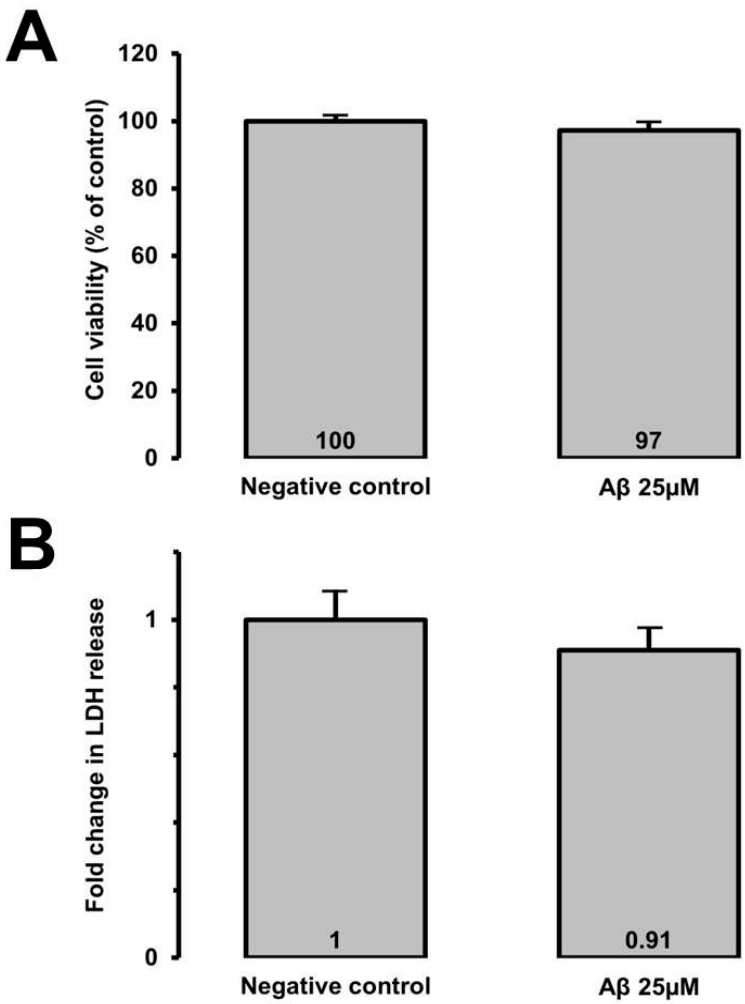


Figure 1: Cell viability (necrosis assessment) using global redox potential (A) and cytotoxicity using extracellular LDH dosage (B) were evaluated after Aβ incubation for 48h.

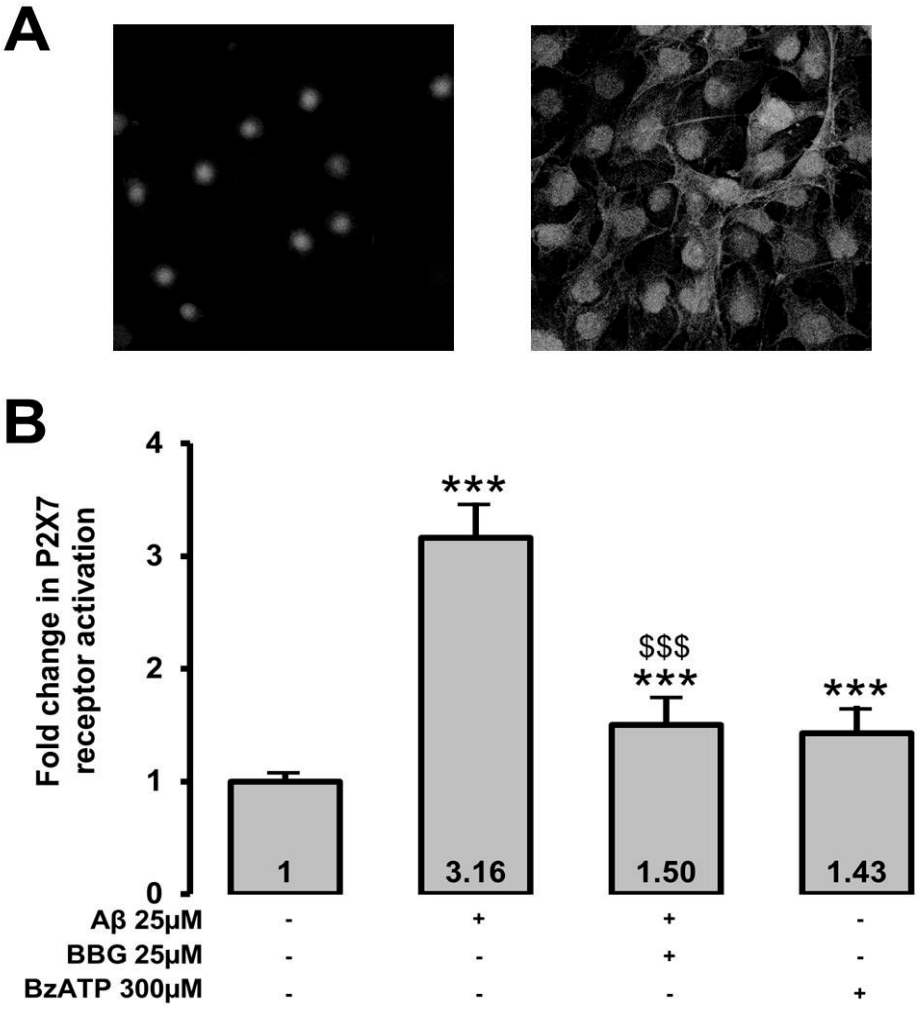


Figure 2: Expression and activation of P2X7 receptor in MIO-M1 cells.

(A) Isotype control (left) and P2X7 receptor labeling (right). Cells were observed using confocal microscopy (x200). Pictures are a merge between nuclei and P2X7 staining. (B) P2X7 receptor activation using YO-PRO-1 assay was evaluated after Aβ incubation for 48h. *** $p < 0.001$ compared to negative control, $^{\$\$\$}$ $p < 0.001$ compared to Aβ.

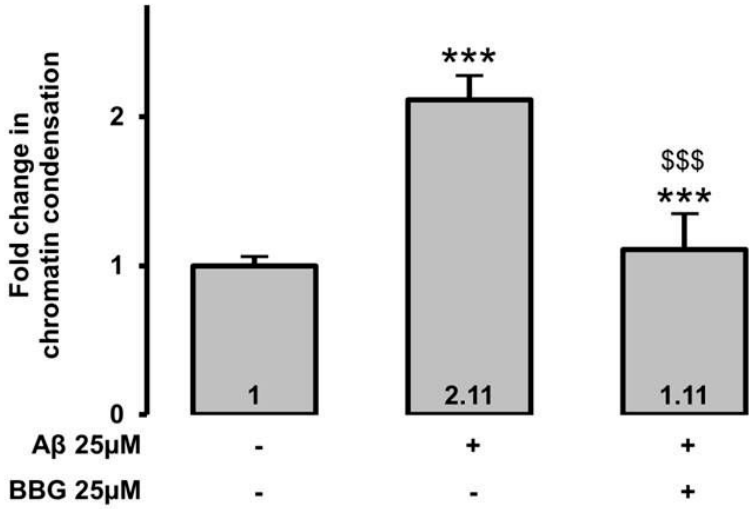


Figure 3: Chromatin condensation after Aβ incubation for 48h.

Chromatin condensation using Hoechst 33342 assay was evaluated after Aβ incubation for 48h. *** $p < 0.001$ compared to negative control, $$$ $p < 0.001$ compared to Aβ.

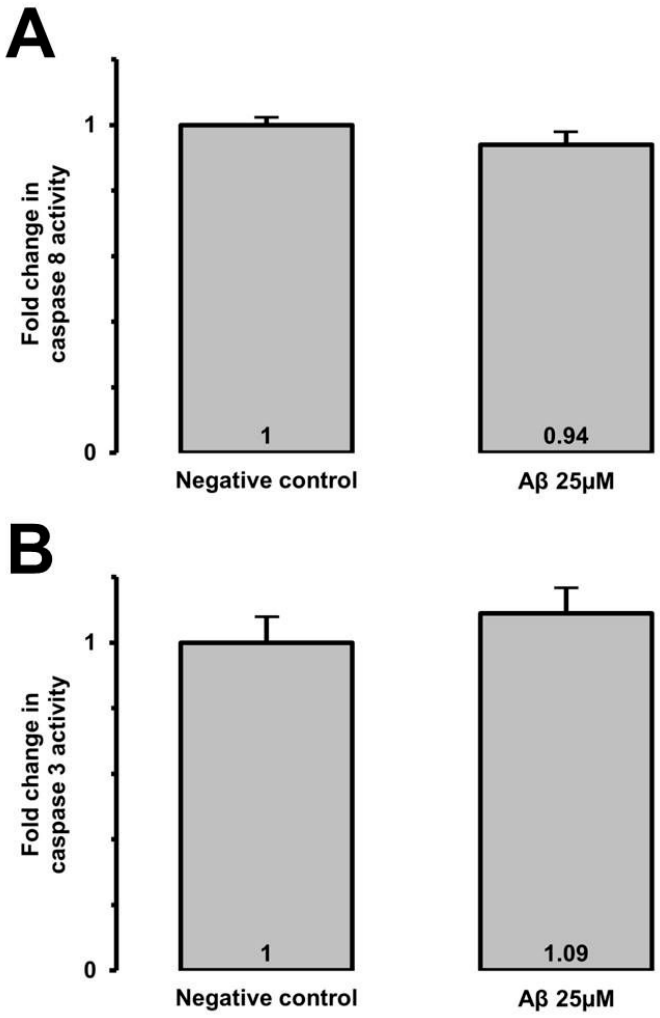


Figure 4: Caspases activation after Aβ incubation for 48h.

(A) Caspases 8 and (B) caspase 3 activation were evaluated after Aβ incubation for 48h.

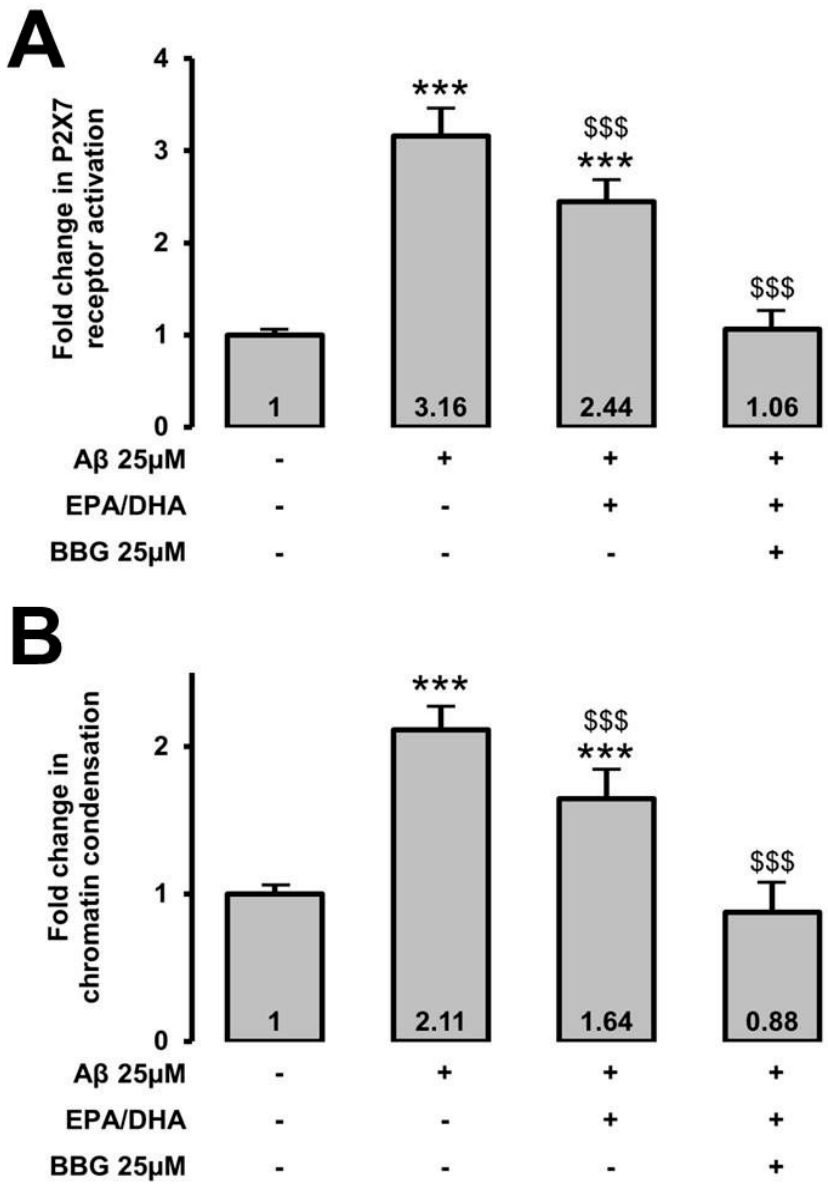


Figure 5: Aβ-induced apoptosis modulation with marine EPA and DHA lipid formulation.

(A) P2X7 receptor activation and (B) chromatin condensation were evaluated after preincubation with fish EPA-DHA oil for 15min and Aβ incubation for 48h. *** $p < 0.001$ compared to negative control, $^{\$\$\$}$ $p < 0.001$ compared to Aβ.

	Fish YS-2636
C20:5 ω3 EPA	36
C22:6 ω3 DHA	26
Mixed tocopherol	3.6

Table 1: EPA and DHA (%) and tocopherol (mg/g) composition of tested oil

Annexe C. Article 3

Soumis dans la revue Toxicology in vitro

Mélody DUTOT, Kamelia GHAZI, Anaïs WAKX, Roxane FAGON, Patrice RAT

Microplate cytometry for high throughput screening cell viability assays: importance of the chemical properties of tested products

OPTIMIZATION OF CELL-BASED CYTOTOXICITY ASSAYS: IMPORTANCE OF THE CHEMICAL PROPERTIES OF TESTED PRODUCTS

Mélody DUTOT[a,b], Kamelia GHAZI[a], Anaïs WAKX[a], Roxane FAGON[b], Patrice RAT[a]

[a]Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire (EA 4463), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, 75 006 Paris, France

[b]Yslab, Recherche et Développement, Quimper, France

Corresponding author: Dr Mélody DUTOT

melody.dutot@yslab.fr

Phone: +33 1 53 73 98 21; Fax: +33 1 43 26 71 22

ABSTRACT

The aim of this study was to compare cell viability assays for the evaluation of the cytotoxicity of different chemical substances. A fibroblastic cell line was exposed to three surfactants (cationic-benzalkonium chloride, anionic-sodium dodecylsulfate, non-ionic-Tween20), two pH modulators (sodium hydroxide and hydrochloric acid), two solvents (ethanol and DMSO) and two lipid formulations (olive and Nyamplung oils) for 15 minutes. Following incubation, cell viability was evaluated using neutral red, MTT and alamar blue assays and cell death was evaluated using the lactate dehydrogenase (LDH) release assay. We observed that cell viability was higher with the neutral red assay than with MTT and alamar blue assays to evaluate surfactants, sodium hydroxide, ethanol and lipid formulations cytotoxicity. The amount of released LDH after cationic surfactants, pH modulators and ethanol incubation was greatly less than in control cells, so the LDH release quantification was not convenient for these chemicals. In conclusion, different sensitivity was observed for each chemical substance with alamar blue and MTT assays being the most sensitive tests in detecting cytotoxic events.

Keywords: fluorescence, cytofluorometry, microplate, cytotoxicity

INTRODUCTION

The early prediction of potential toxicity is highly desirable in order to minimize use of animals, costs and time in drug development. The 3R principle is 53 years old (Russell and Burch, 1959). The 3R stand for Replacement as the substitution for conscious living higher animals of insentient material (cell culture, *in silico* modeling…), Reduction as using the minimum number of animals necessary to obtain information of given amount and precision and Refinement as any decrease in the nature, severity or incidence of inhumane procedures to those animals which still have to be used. In this context, alternative methods to animal testing appear of most importance. In December 2006, following seven years of discussion and debate, the European Union finalized new legislation on the control of chemicals through the REACH program (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals). Article 1 states that one of the objectives of REACH is the promotion of alternative methods for assessment of hazards of substances {Union, 2006 #20}. Besides, animal testing is prohibited in the European Union since 2004 for cosmetic products and since 2009 for cosmetic ingredients, and it is prohibited to market cosmetic products containing ingredients which have been tested on animals. Considerable progress has been made in recent years in validating in vitro alternatives to animal tests. It is not a full replacement, but strategic combinations of several alternative test methods within a tiered testing strategy may be able to replace the most complex human health effects. Among alternative test methods, cytotoxicity assays have to be dealt with in depth. Many methods of analysis exist for assaying test substances for cytotoxicity and other cellular responses. Among them, the evaluation of mitochondrial activity, lysosome incorporation, membrane integrity, and intracellular redox potential are the most popular markers to evaluate cell viability.

To assess mitochondrial activity, the MTT test is the simplest test. MTT is a water-soluble yellow dye that is readily taken up by viable cells and reduced by the action of mitochondrial dehydrogenases, mainly succinate deshydrogenase (Schiff et al., 1985). The reduction product is a water-insoluble blue formazan, which must then be dissolved for colorimetric measurement.

To assess lysosome incorporation, neutral red test is based on the ability of viable cells to incorporate and bind the supravital dye neutral red, a weak cationic supravital dye that readily penetrates cell membranes by non-ionic diffusion and predominately accumulates intracellularly in lysosomes (Borenfreund and Puerner, 1985). Alterations of the cell surface of the sensitive lysosomal membrane lead to lysosomal fragility and other changes that gradually become irreversible. Lysosomal fragility leads to lysosome inability to uptake and store neutral red. It is then possible to distinguish between viable, damaged, or dead cells via colorimetric or fluorometric measurements.

To assess membrane integrity, the release of lactate dehydrogenase (LDH) is commonly used (Fischer, 1975). Intracellular enzymes such as LDH are only released after damages to cell membranes. Thus, the larger the rate of LDH release is, the greater the extent of cell death that occurred in that period is.

To assess intracellular redox potential, alamar blue test is used (O'Brien et al., 2000). When cells are alive, they maintain a reducing environment within the cytosol of the cell. Resazurin, the chemical name of alamar blue, is a cell permeable compound that is blue in color and non-fluorescent. Upon entering cells, resazurin is reduced to resorufin, a compound that is red in color and highly fluorescent. Viable cells continuously convert resazurin to resorufin, increasing the overall fluorescence and color of the media surrounding cells.

These four tests rely on different cell events, but most of the time, little attention is paid to the choice of the test. And yet, the chemical properties of the tested substance can influence the penetration and/or the reactivity of the dye. Indeed, for example Said *et al.* observed an increase in neutral red incorporation after cell incubation with oil formulations (Nyamplung oil) whereas BrdU incorporation was unchanged (Said et al., 2007a). Besides, parameters such as color or pH of the tested substance can interfere with colorimetric dyes such as MTT and pH-sensitive dyes such as neutral red. The aim of our study was to improve the relevance of in vitro eye irritation methods through the evaluation of cell viability using four cell markers: mitochondrial activity, lysosome incorporation, membrane integrity, and intracellular redox potential after incubation of fibroblastic cells with different substances. We selected cationic, anionic and non-ionic surfactants, pH modulators (acid and basic), solvents, and lipid formulations.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Materials for cell culture were provided from Eurobio (Les Ulis, France). Benzalkonium chloride (BAC), sodium dodecylsulfate (SDS), Tween 20, sodium hydroxide (NaOH), acetic acid, ethanol, MTT, neutral red, resazurin, LDH kit and refined olive oil were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Nyamplung oil was purchased from Soliance (Pomacle, France).

Cell culture

The NCTC L 929 fibroblastic cell line (ATCC® CCL-1™) was chosen according to ISO 10993-5 standard that recommends the use of this cell line for evaluating in vitro

cytotoxicity of medical devices {InternationalOrganizationforStandardization, 2010 #45}. Cells were cultured under standard conditions (moist atmosphere of 5% CO2 at 37°C) in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml penicillin and 50 IU/ml streptomycin. The medium was changed every 3 days. Confluent cultures were removed by trypsin incubation, and then cells were counted. They were seeded into 96-well culture microplates at a density of 60,000 cells/mL (200µL/well) for microtitration analysis. Cultures were kept in moist atmosphere of 5% CO2 at 37°C for 24 hours.

Incubation protocols

Whenever the cells reached subconfluence, the culture medium was removed and they were exposed to the above chemicals for 15 minutes to reflect the actual conditions of foreign material clearance and to distinguish between non- and moderate irritants. After the incubation time, supernatants were collected for the quantification of LDH release. The cells were then rinsed with phosphate buffer saline (PBS) and incubated with the dye solution. PBS was used as control.

For oil formulations, the cells were exposed to neat olive oil or Nyamplung oil at different concentrations (dilution in olive oil) for 15 minutes. The cells were then rinsed with PBS and incubated with culture medium for 24 hours (Dutot et al., 2011; Dutot et al., 2009; Said et al., 2007a; Said et al., 2007b). Supernatants were collected for the quantification of LDH release. The cells were then rinsed with PBS and incubated with the dye solution. Culture medium was used as control.

Mitochondrial activity using the MTT test

The activity of mitochondrial deshydrogenase was measured using the MTT assay. It is based on the reduction of yellow tetrazolium salt MTT onto water-insoluble purple formazan salt by viable cells (Figure 1) (Schiff et al., 1985). The cells were incubated with MTT solution (0.5mg/mL in culture medium without FBS) for 3 hours and rinsed with PBS. Formazan salt was solubilized in DMSO and absorbance detection (λabs = 540 nm) was undertaken with a microplate colorimeter (Safire, Tecan, France).

Lysosome incorporation using the neutral red test

The incorporation of neutral red in lysosomes can be extrapolated to cell viability (Figure 2) (Borenfreund and Puerner, 1985). The cells were incubated with neutral red solution (50mg/mL in culture medium without FBS) for 3 hours and rinsed with PBS. Neutral red was extracted from viable cells using 1% acetic acid-50% ethanol and fluorescence (λexc = 535 nm, λem = 600 nm) was read using a microplate fluorometer (Safire, Tecan, France) according to our published protocol (Dutot et al., 2010; Rat et al., 1994).

Membrane integrity using the LDH release test

The LDH assay measures membrane integrity as a function of the amount of cytoplasmic LDH released into the extracellular medium (Fischer, 1975). Briefly, cell supernatants were incubated with LDH mixture containing NAD as LDH substrate and tetrazolium dye (the mixture was prepared according to manufacturer's instructions) for 30 minutes (Figure 3). Absorbance detection (λabs = 490 nm) was undertaken with a microplate colorimeter (Safire, Tecan, France).

Intracellular redox potential using the alamar blue test

Alamar Blue assay uses resazurine, a visible blue fluorogene probe, which is reduced to a red fluorescent compound (resorufin) by cellular redox enzymes (Figure 4) (O'Brien et al., 2000). The cells were incubated with resazurine solution (0.1 mg/ml) containing culture medium supplemented with 2.5% FBS. After a 6-h incubation time, resorufin fluorometric signal (λexc = 535 nm, λem = 600 nm) was undertaken with a microplate fluorometer (Safire, Tecan, France) according to our published protocol (Dutot et al., 2008; Perrot et al., 2003).

Data analyses

Data in the text and graphs are shown as fluorescence or absorbance percentage of the control, and statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test (α risk=0.005): ***p<0.001, **p<0.005, *p<0.01 compared to PBS control. Each chemical was tested in 6 wells and each test was performed in triplicate.

RESULTS

Surfactants: Benzalkonium chloride (BAC), sodium dodecylsulfate (SDS), Tween 20

In figure 5A, the three cell viability tests showed a significant concentration-dependent decrease in cell viability after incubation with BAC, SDS and Tween. Neutral red, MTT and alamar blue tests yielded similar results, i.e. a decrease in cell viability after incubation with BAC at 0.001% and 0.002% and SDS at 0.005%. After SDS 0.01% incubation, the percentage of living cells was 21% according to the neutral red test whereas it was 5% and 8% according to MTT and alamar blue tests, respectively. The same gap between neutral red results and MTT-alamar blue results was observed after Tween 1% incubation.

In figure 5B, the LDH release test showed a concentration-dependent increase in cell death induced by BAC, SDS and Tween, but cell death was statistically significant only for SDS and Tween.

pH modulators: NaOH, acetic acid

In figure 6A, MTT and alamar blue tests yielded similar results, i.e. a decrease in cell viability after incubation with both NaOH concentrations (around 50% for NaOH 0.02% and around 6% for NaOH 0.04% compared to control). Neutral red results after NaOH incubation gave higher percentages of cell viability than MTT and alamar blue tests. For the lowest acetic acid concentration (0.1%), MTT results were not significant whereas neutral red and alamar blue were ($p<0.001$). After acetic acid 0.2% incubation, MTT results (81% of cell viability) were still higher than neutral red and alamar blue results (both tests showed 50% of cell viability). For the highest acetic acid concentration (0.4%), neutral red results showed 30% of cell viability whereas MTT and alamar blue tests yielded similar results around 15% of cell viability.

In figure 6B, the LDH release test showed very weak signals after NaOH and acetic acid incubation, inferior to 25% of control for all concentrations. LDH release after NaOH and acetic acid incubation was lower than in control cells.

Alcohol solvent: ethanol

In figure 7A, only MTT test showed statistically significant loss of cell viability after ethanol 1% incubation (78% compared to negative control). After ethanol 10%, neutral red still did not show any significant decrease in cell viability, contrary to MTT and alamar blue tests. Neutral red signal increases with ethanol concentration for the two highest doses: 30%

of cell viability after ethanol 20% and 38% of cell viability after ethanol 50%. Alamar blue test showed the same range of results for ethanol 20% and 50% (10% of cell viability and 7% of cell viability, respectively), whereas MTT showed a significant concentration-dependent decrease in cell viability.

In figure 7B, LDH release results showed weak signals after ethanol incubation. Ethanol induced a concentration-dependent decrease in LDH release. As well as for NaOH and acetic acid, LDH release after ethanol incubation was lower than in control cells.

Lipid formulations: olive oil and Nyamplung oil

In figure 8A, neutral red results did not show any significant decrease in cell viability after olive oil incubation whereas MTT and alamar blue did, but error bars with neutral red results were important. Neutral red and MTT tests yielded very similar results for Nyamplung oil, i.e. a decrease in cell viability around 61% at 4% and around 49% at 8%. Alamar blue test showed lower rates of cell viability after Nyamplung oil incubation than neutral red and MTT tests.

In figure 8B, olive oil induced cell death (x1.11 compared to control), as well as Nyamplung oil 4% (x1.38 compared to control) and 8% (x1.42 compared to control).

DISCUSSION

The safety assessment of cosmetics as demanded by Directive 76/768/EEC strives to protect the consumer on one side, while avoiding animal experiments on the other side (TheCouncilofthe EuropeanCommunities, 1976). In this respect, safety assessment process has to be predictive, reproductive and reliable. ISO standard for the evaluation of medical devices cytotoxicity (ISO 10993-5) recommends four tests: the neutral red assay, the colony

forming assay (similar to the classic Japanese cytotoxicity assay described in the Japanese guidelines for preclinical biological evaluation of medical materials and devices), the MTT assay, and the XTT assay (InternationalOrganizationforStandardization, 2010). In the field of toxicology, scientists are mainly used to MTT, neutral red and LDH leakage assays (Fotakis and Timbrell, 2006; Jafari et al., 2011; Jin et al., 2010; Saquib et al., 2012; Tomankova et al., 2011). We chose to compare these three tests plus the alamar blue assay (as recommended by French standard NF S11820) for the evaluation of the in vitro toxicity of different chemicals: surfactants (cationic, anionic and non-ionic), pH modulators (acid and base), alcohol solvent and lipid formulations. All of these chemicals are used in cosmetics or medical preparations, or both. Surfactants are widely used to reduce the surface tension of water. They are made up of water soluble (hydrophilic) and water insoluble (hydrophobic) components. Surfactants are able to suspend gas, immiscible liquid, or solid in water or some other liquid. They are used as foaming, emulsifying, solubilizing, or conditioning agents. In pharmaceutical and cosmetic industries, acids such as acetic acid or hydrochloric acid, and bases such as sodium hydroxide or potassium hydroxide are used for pH and acidity/alkalinity adjustment. Alcohol solvents are used in some cosmetics and external medical preparations for their capacity to dissolve organic substances present for example in astringents (facial toner and aftershave), antiseptics, perfumes, personal insect repellents… Lipid formulations are used as active principles or vehicles in medical devices (olive or maize oils in eye drops for example), or cosmetics (sunscreen formulations). The concentrations of chemicals we chose were based on their ability to induce mild to high cytotoxicity.

We observed that cell viability results differ according to the assay. For the most cytotoxic chemicals concentrations, neutral red results differed from MTT and alamar blue results. Globally, neutral red assay appears as the less sensitive assay that we performed.

MTT test seems to be not adapted to the lowest acetic acid concentrations because it did not show any cytotoxicity at 0.1% and gave a clearly higher percentage of living cells than neutral red and alamar blue tests.

LDH release assay gave aberrant results with NaOH, acetic acid and ethanol as the amount of released LDH was greatly less than in control cells. In case of cell death, LDH release increases compared to negative control but it cannot decreases, therefore LDH results obtained with NaOH and acetic acid may be artifact. The assay is based on the reduction of NAD by LDH present in cell supernatants in case of cytotoxicity. The resulting reduced NAD (NADH) is utilized in the stoichiometric conversion of tetrazolium dye. The reaction is then terminated by the addition of hydrochloric acid used as a stop solution. If the pH of cell supernatants is acid (after acetic acid or ethanol incubation in the present study), the reaction between NAD and LDH cannot occur. It appeared that basic pH (NaOH in the present study) may also interfere with the reaction as we observed the same kind of artifact. LDH release assays performed on cells incubated with SDS, Tween and lipid formulations yielded comparative results than cell viability tests: for Nyamplung oil at 4%, we observed +38% of cell death (LDH release assay) and about 59% of living cells (i.e. 41% of dead cells). With BAC, LDH release results were not statistically significant.

Of the four employed assays, the most sensitive tests were MTT and the alamar blue assays that both showed significant decrease in cell viability in a concentration-dependent manner with little error bars. These results are in accordance with a recent study (Fotakis and Timbrell, 2006), and recently, authors developed a new criterion for eye irritation potential based on the MTT assay {Cho, 2012 #97}. MTT evaluates the activity of mitochondrial succinate dehydrogenase and alamar blue evaluates the intracellular redox

potential, so both tests reflect the metabolic state of cells. Assays based on cell metabolism seem to be more reliable than assays based on membrane integrity.

To conclude, the chemical properties of the tested substance influence the penetration and/or the reactivity of the dye. Therefore, the assay to perform in order to evaluate the in vitro toxicity of chemicals has to be carefully selected to avoid any misinterpretation of the results. Table 1 gives useful keys to assess the potential risk of chemicals found in cosmetic and medical preparations.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank Adebiopharm ER67 for their financial support.

REFERENCES

Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicol Lett 24, 119-124.

Dutot, M., de la Tourrette, V., Fagon, R., Rat, P., 2011. New approach to modulate retinal cellular toxic effects of high glucose using marine EPA and DHA. Nutr Metab (Lond) 8, 39-44.

Dutot, M., Liang, H., Martin, C., Rousseau, D., Grynberg, A., Warnet, J.M., Rat, P., 2009. Per os administered refined olive oil and marine PUFA-rich oils reach the cornea: possible role on oxidative stress through caveolin-1 modulation. Nutr Metab (Lond) 6, 48-56.

Dutot, M., Reveneau, E., Pauloin, T., Fagon, R., Tanter, C., Warnet, J.M., Rat, P., 2010. Multipurpose solutions and contact lens: modulation of cytotoxicity and apoptosis on the ocular surface. Cornea 29, 541-549.

Dutot, M., Warnet, J.M., Baudouin, C., Rat, P., 2008. Cytotoxicity of contact lens multipurpose solutions: role of oxidative stress, mitochondrial activity and P2X7 cell death receptor activation. Eur J Pharm Sci 33, 138-145.

European Centre for the Validation of Alternative Methods, 2012. Method Validation.

Fischer, A.B., 1975. Gentamicin as a bactericidal antibiotic in tissue culture. Med Microbiol Immunol 161, 23-39.

Fotakis, G., Timbrell, J.A., 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicol Lett 160, 171-177.

International Organization for Standardization, 2010. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization.

Jafari, N., Bohlooli, S., Mohammadi, S., Mazani, M., 2011. Cytotoxicity of Methylsulfonylmethane on Gastrointestinal (AGS, HepG2, and KEYSE-30) Cancer Cell Lines. J Gastrointest Cancer.

Jin, S., Yang, F., Hui, Y., Xu, Y., Lu, Y., Liu, J., 2010. Cytotoxicity and apoptosis induction on RTG-2 cells of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) and decabrominated diphenyl ether (BDE-209). Toxicol In Vitro 24, 1190-1196.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur J Biochem 267, 5421-5426.

Organisation for Economic Co-operation and Development guideline for the testing of chemicals, 2012. Test Guideline 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.

Perrot, S., Dutertre-Catella, H., Martin, C., Rat, P., Warnet, J.M., 2003. Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. Toxicol Sci 72, 122-129.

Rat, P., Korwin-Zmijowska, C., Warnet, J.M., Adolphe, M., 1994. New in vitro fluorimetric microtitration assays for toxicological screening of drugs. Cell Biol Toxicol 10, 329-337.

Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. The Principles of Humane Experimental Technique. Metheun & Co Ltd, London.

Said, T., Dutot, M., Christon, R., Beaudeux, J.L., Martin, C., Warnet, J.M., Rat, P., 2007a. Benefits and side effects of different vegetable oil vectors on apoptosis, oxidative stress, and P2X7 cell death receptor activation. Invest Ophthalmol Vis Sci 48, 5000-5006.

Said, T., Dutot, M., Martin, C., Beaudeux, J.L., Boucher, C., Enee, E., Baudouin, C., Warnet, J.M., Rat, P., 2007b. Cytoprotective effect against UV-induced DNA damage and oxidative stress: role of new biological UV filter. Eur J Pharm Sci 30, 203-210.

Saquib, Q., Al-Khedhairy, A.A., Siddiqui, M.A., Abou-Tarboush, F.M., Azam, A., Musarrat, J., 2012. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. Toxicol In Vitro 26, 351-361.

Schiff, D., Chan, G., Poznansky, M.J., 1985. Bilirubin toxicity in neural cell lines N115 and NBR10A. Pediatr Res 19, 908-911.

The Council of the European Communities, 1976. Cosmetics Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. European commission.

The European Parliament and the Council of the European Union, 2003. Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. Official Journal of the European Union.

The European Parliament and the Council of the European Union, 2006. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). Official Journal of the European Union.

Tomankova, K., Kejlova, K., Binder, S., Daskova, A., Zapletalova, J., Bendova, H., Kolarova, H., Jirova, D., 2011. In vitro cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants. Toxicol In Vitro 25, 1242-1250.

Table 1. Cytotoxicity assays that we recommend as a function of the chemical nature of the tested substance.

	Neutral red	MTT	Alamar blue	LDH release
Cationic surfactants	✓	✓	✓	×
Anionic surfactants	×	✓	✓	✓
Non-ionic surfactants	×	✓	✓	✓
Bases	×	✓	✓	×
Acids	✓	×	✓	×
Alcohol solvents	×	✓	✓	×
Lipid formulations	×	✓	✓	✓

FIGURES

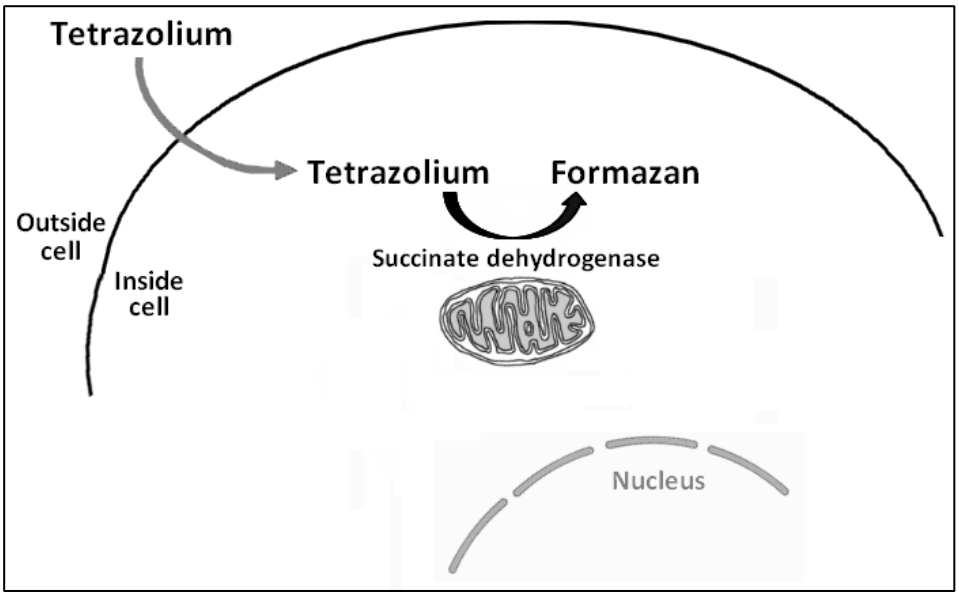


Figure 1. Principle of the MTT assay. Tetrazolium salt (yellow) enters living cells and is reduced by mitochondrial succinate dehydrogenase in formazan (purple).

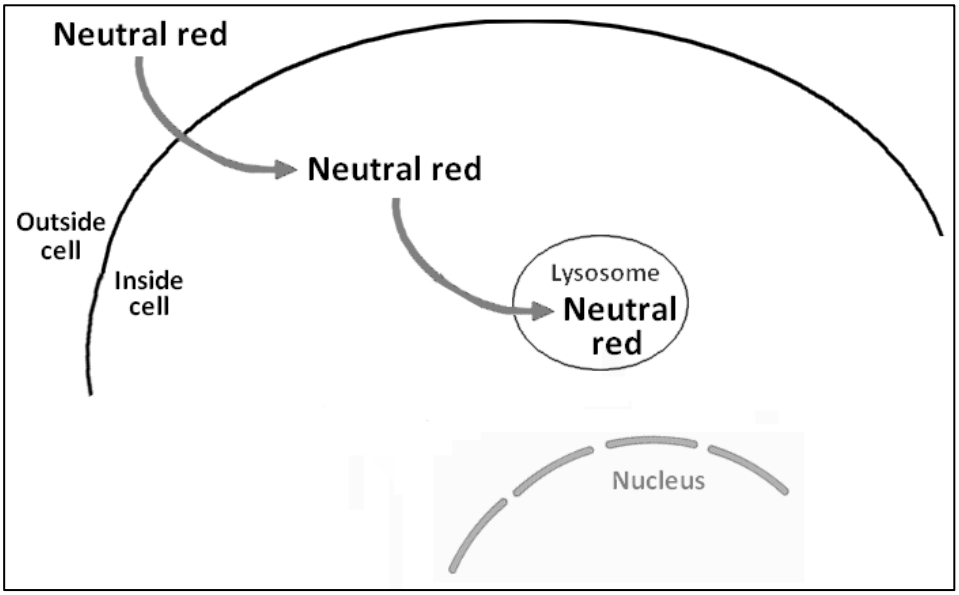


Figure 2. Principle of the Neutral red assay. Neutral red enters living cells and is fixed in lysosomes where pH is acid.

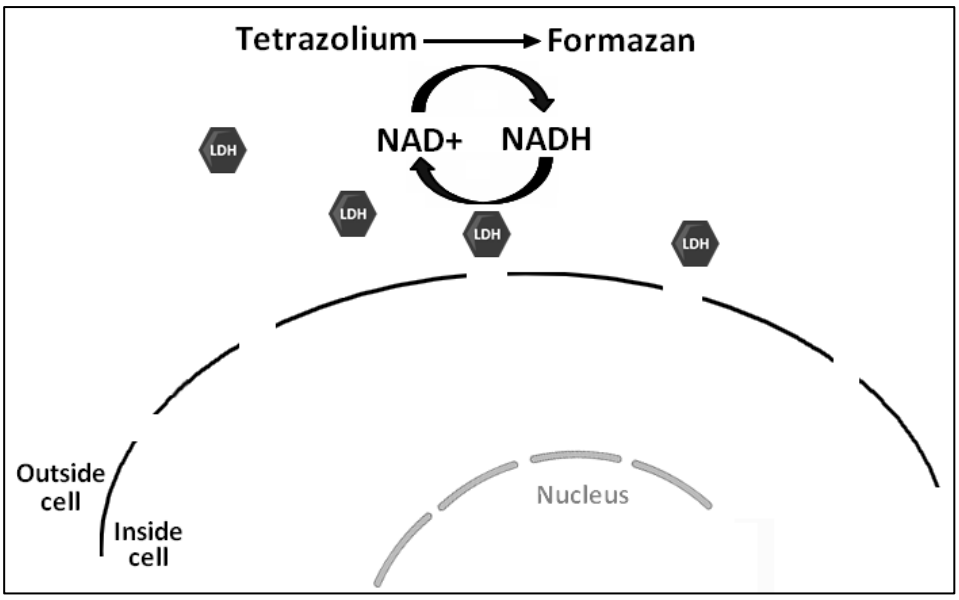


Figure 3. Principle of the LDH release assay. LDH is released from membrane-altered cells and is used in enzymatic reaction to reduce tetrazolium in formazan.

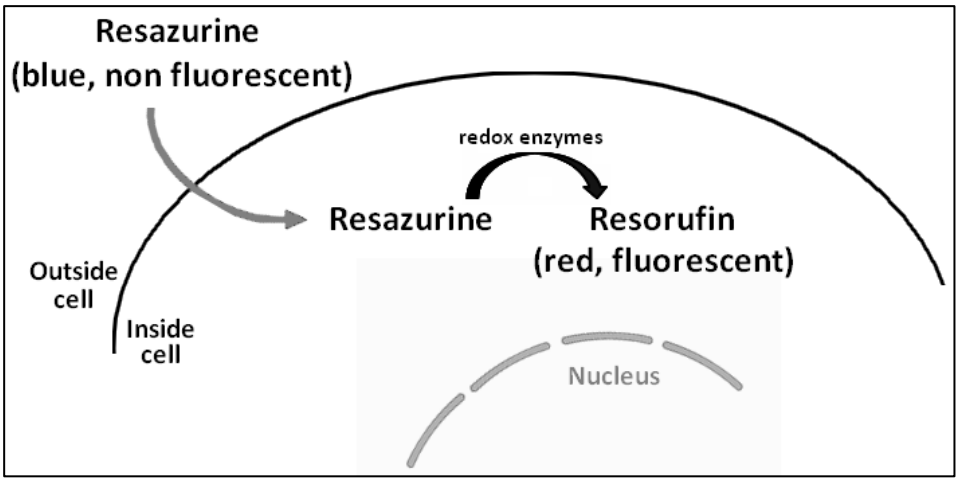


Figure 4. Principle of the Alamar blue test. Resazurine is a blue non fluorescent probe that enters living cells to be reduced in resorufin, which is red and fluorescent.

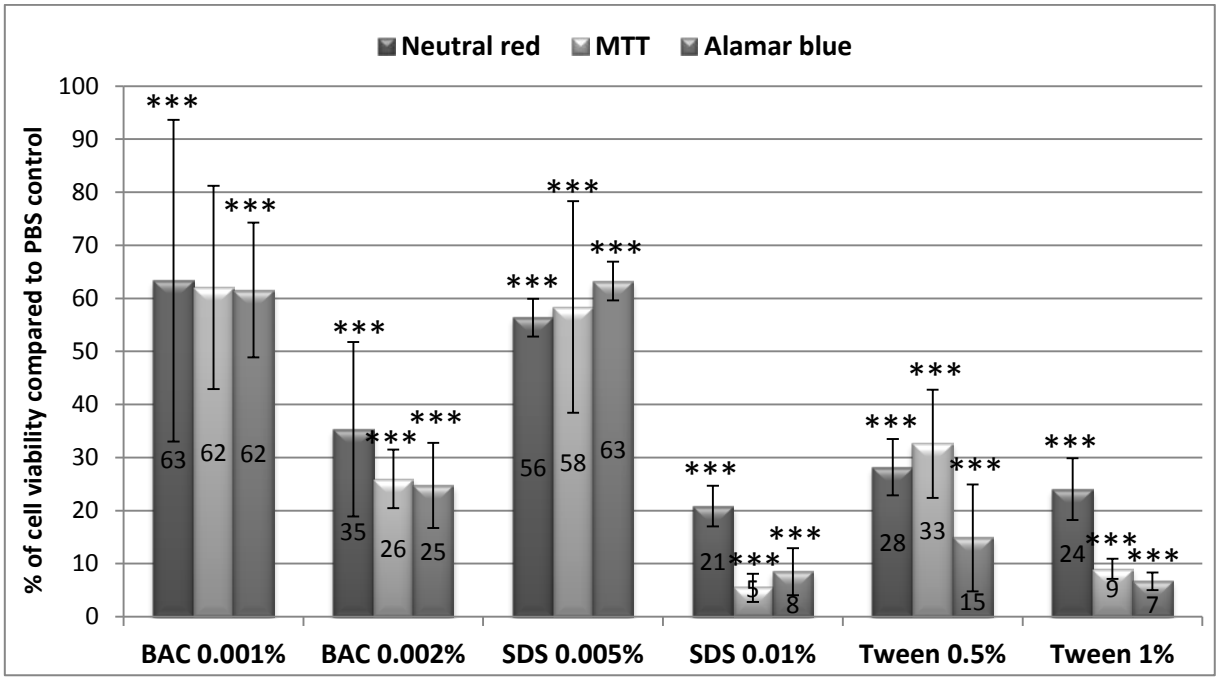


Figure 5A. Cell viability evaluated using three different tests after surfactants incubation. BAC, SDS and Tween were incubated for 15 minutes at 37°C and induced loss of cell viability compared to PBS control that was arbitrary fixed at 100%. Tests were directly performed on living cells. ***p<0.001 compared to PBS control.

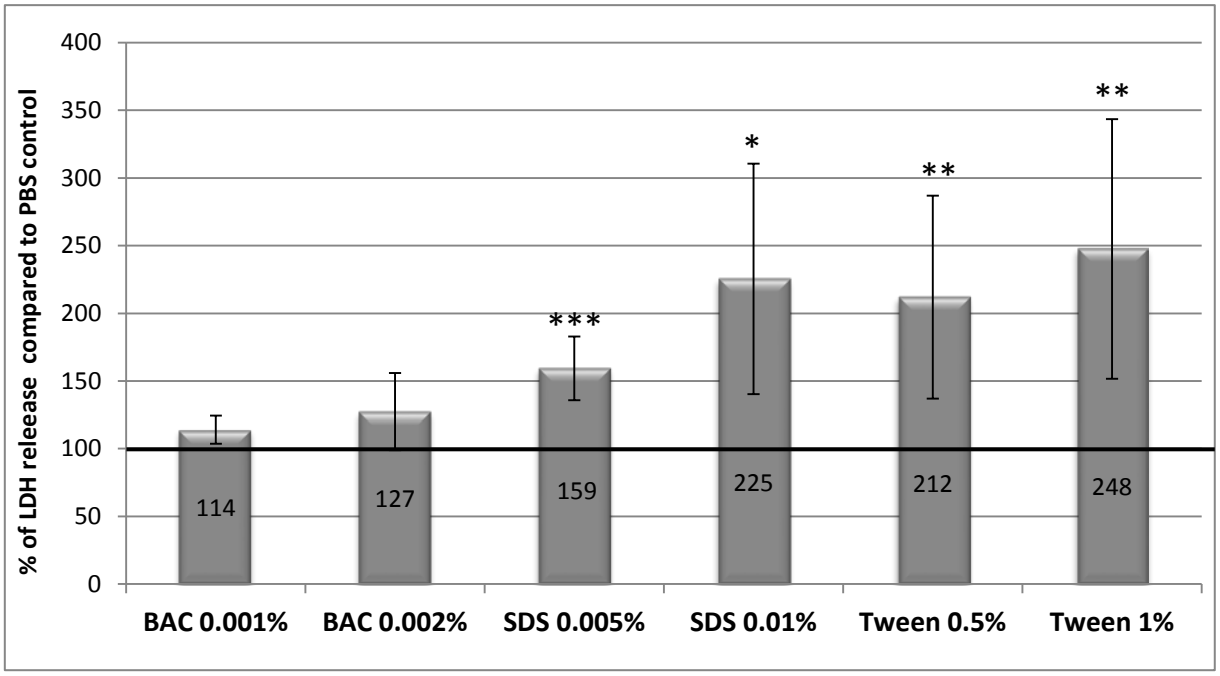


Figure 5B. Cell death evaluated using LDH release test after surfactants incubation.

BAC, SDS and Tween were incubated for 15 minutes at 37°C and induced LDH release compared to PBS control that was arbitrary fixed at 100%. Supernatants were collected for LDH quantification. ***p<0.001, **p<0.005, *p<0.01 compared to PBS control.

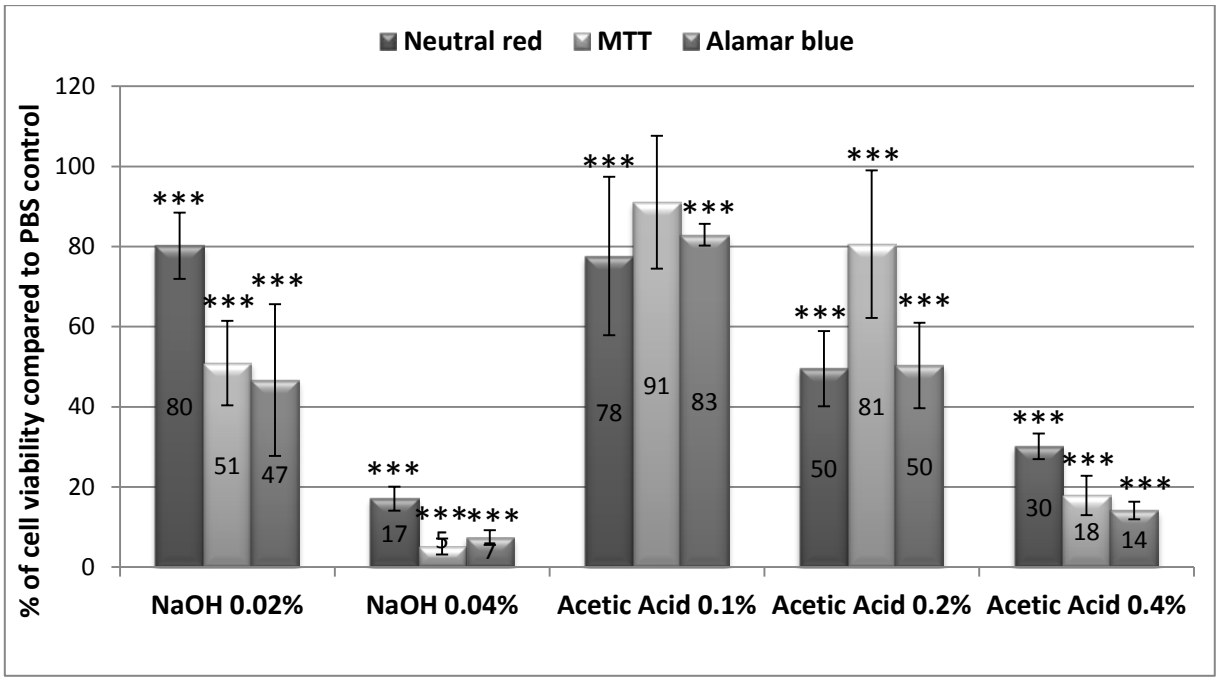


Figure 6A. Cell viability evaluated using three different tests after pH modulators incubation. NaOH and acetic acid were incubated for 15 minutes at 37°C and induced loss of cell viability compared to PBS control that was arbitrary fixed at 100%. Tests were directly performed on living cells. ***p<0.001 compared to PBS control.

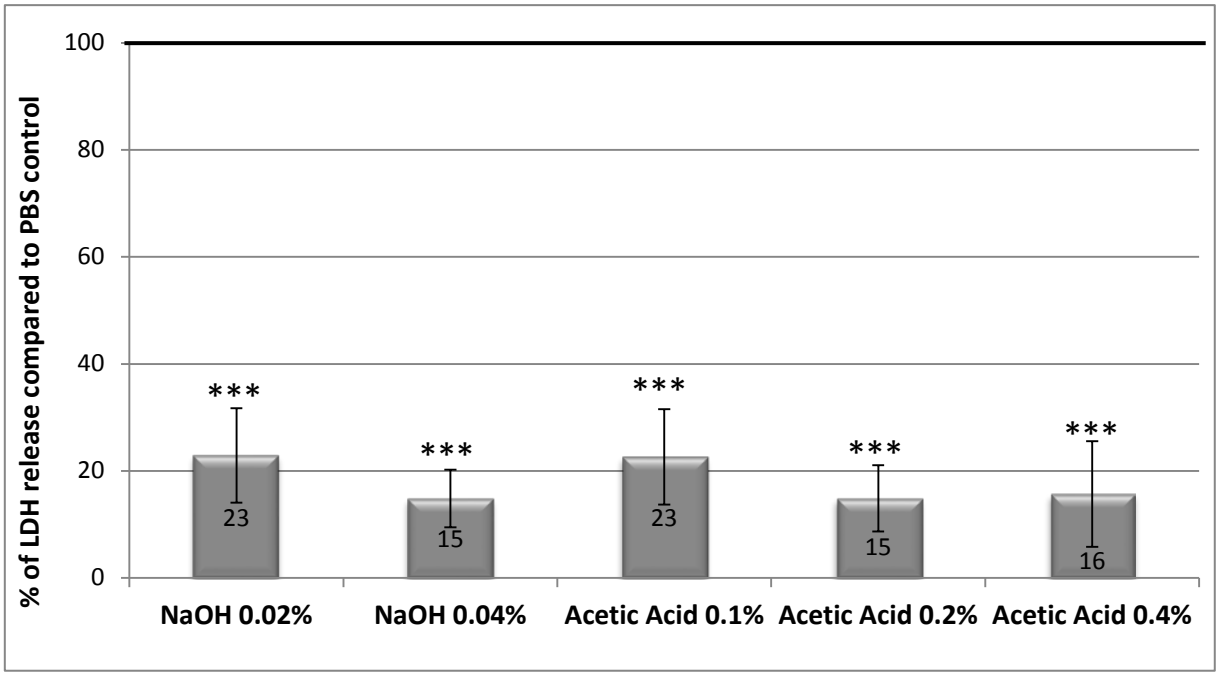


Figure 6B. Cell death evaluated using LDH release test after pH modulators incubation.

NaOH and acetic acid were incubated for 15 minutes at 37°C and inhibited LDH release compared to PBS control that was arbitrary fixed at 100%. Supernatants were collected for LDH quantification. ***p<0.001 compared to PBS control.

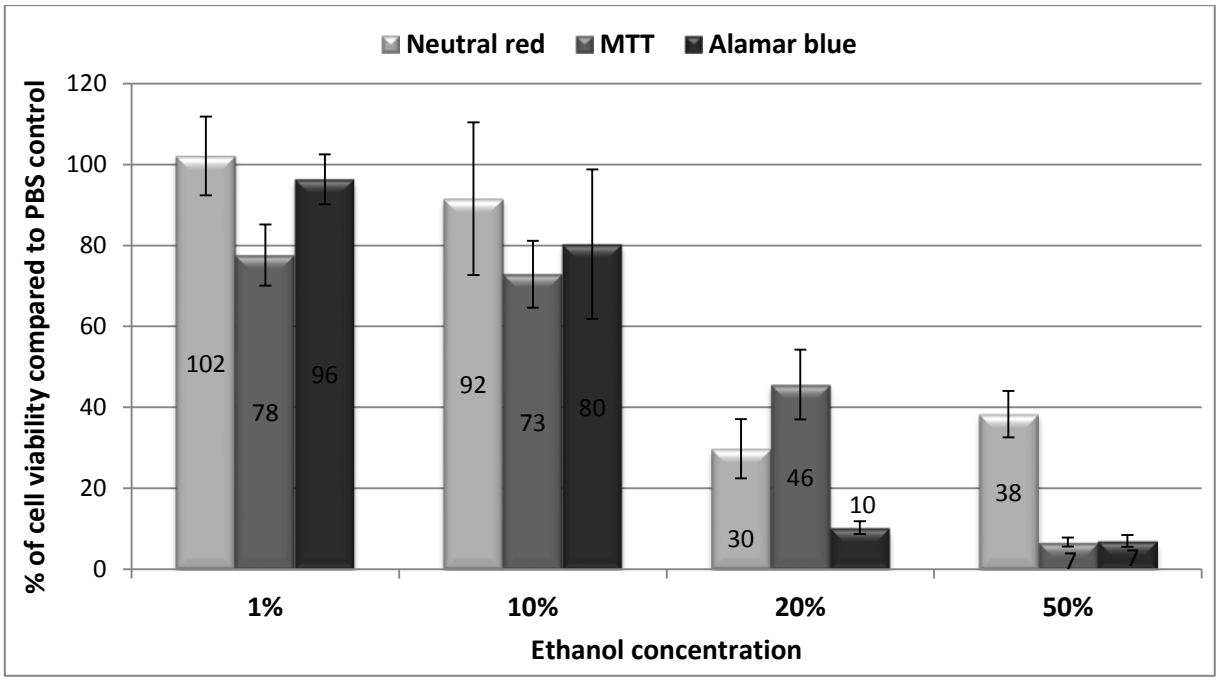


Figure 7A. Cell viability evaluated using three different tests after alcohol solvent incubation. Ethanol was incubated for 15 minutes at 37°C and induced loss of cell viability compared to PBS control that was arbitrary fixed at 100%. Tests were directly performed on living cells. ***p<0.001 compared to PBS control.

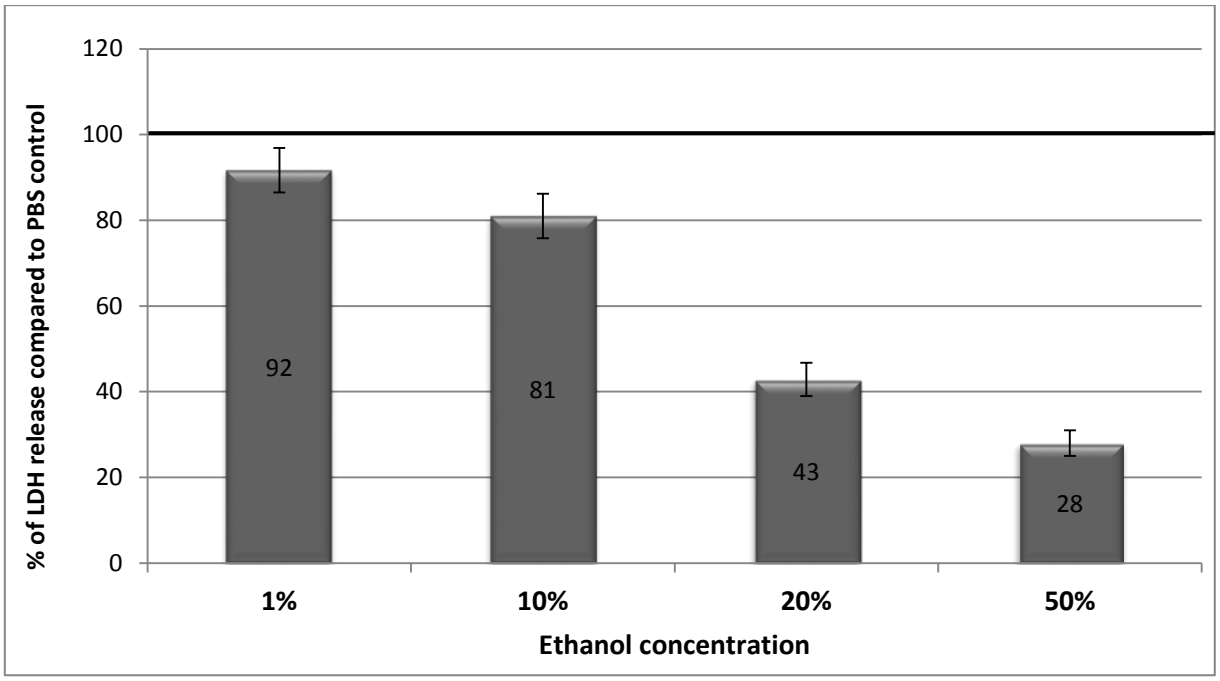


Figure 7B. Cell death evaluated using LDH release test after alcohol solvent incubation.

Ethanol was incubated for 15 minutes at 37°C and inhibited LDH release compared to PBS control that was arbitrary fixed at 100%. S. Supernatants were collected for LDH quantification. ***p<0.001, **p<0.005 compared to PBS control.

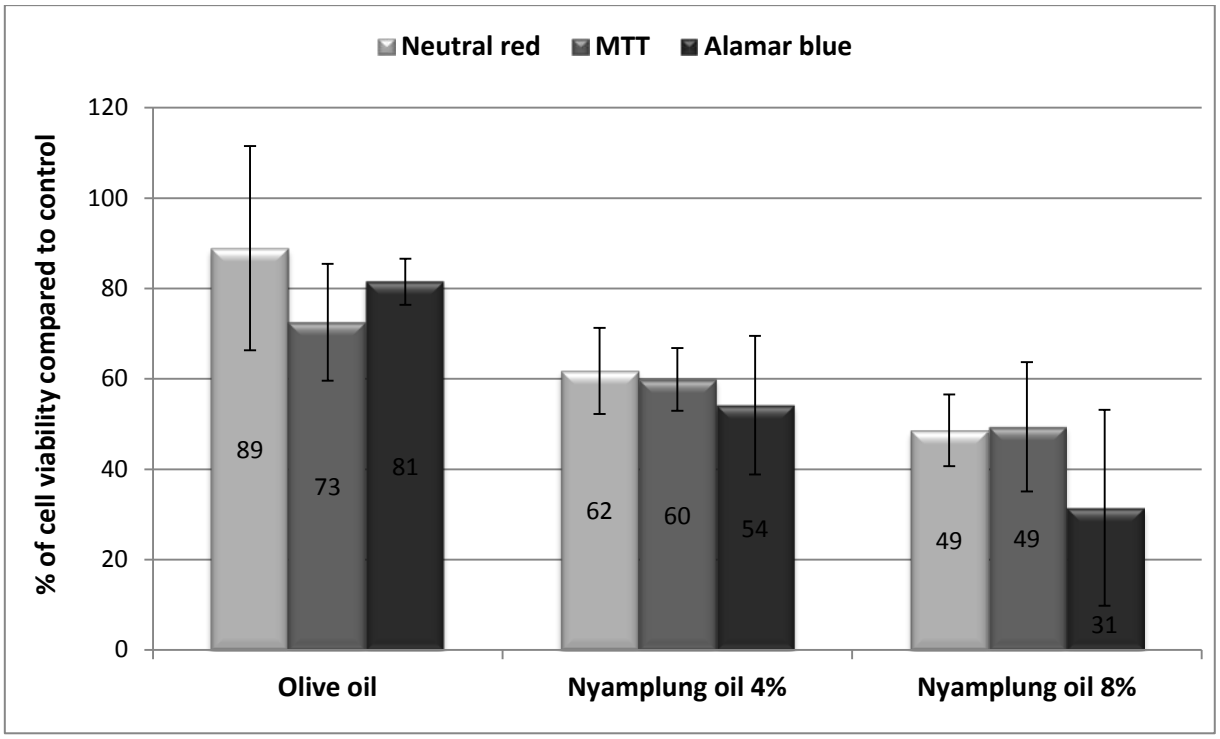


Figure 8A. Cell viability evaluated using three different tests after oil formulations incubation. Olive oil and Nyamplung oil were incubated for 15 minutes at 37°C and induced loss of cell viability compared to negative control that was arbitrary fixed at 100%. Tests were directly performed on living cells. ***p<0.001 compared to PBS control.

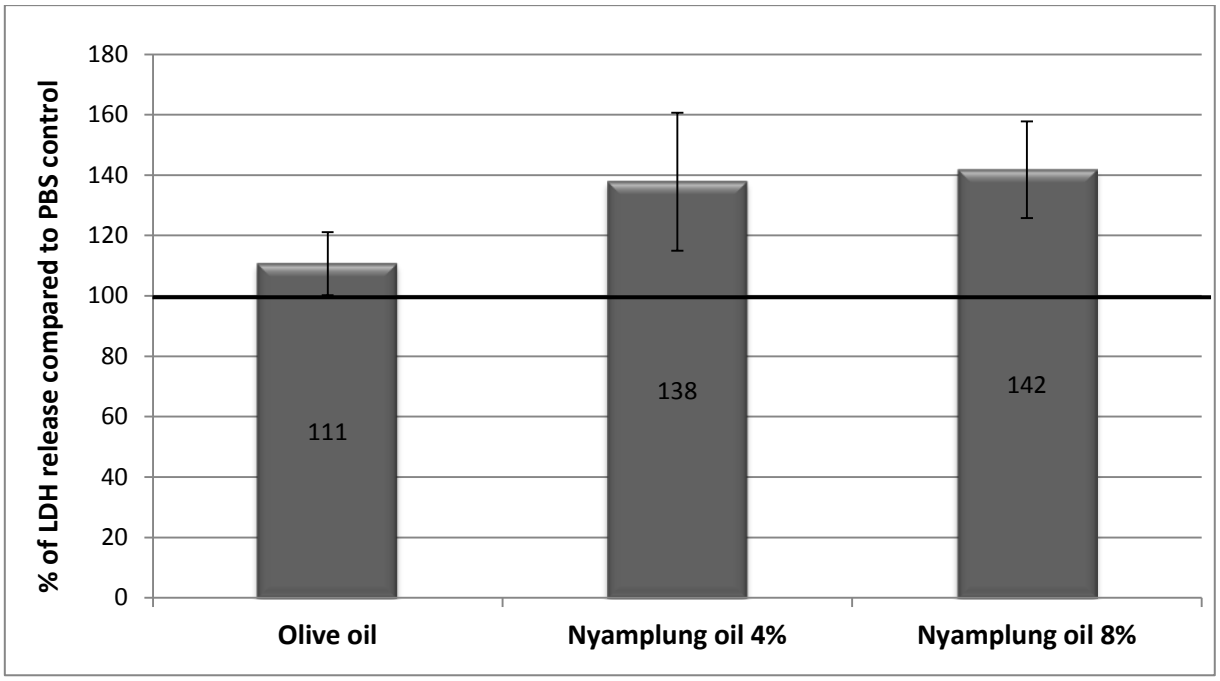


Figure 8B. Cell death evaluated using LDH release test after oil formulations incubation. Olive oil and Nyamplung oil were incubated for 15 minutes at 37°C and induced LDH release compared to negative control that was arbitrary fixed at 100%. Supernatants were collected for LDH quantification. ***p<0.001, **p<0.005 compared to PBS control.

Résumé : L'exposition prénatale à différents agents toxiques est généralement étudiée en considérant le placenta comme une barrière entre la mère et le fœtus ; nous le considérons en tant qu'organe cible des agents toxiques. Pour ce faire, nous avons sélectionné un modèle cellulaire de trophoblastes adapté aux études toxicologiques. En clinique, des pathologies de la grossesse sont associées à des modifications de la sécrétion de l'hormone placentaire lactogène hPL et de l'hormone gonadotrope chorionique hCG. Nos travaux *in vitro* ont permis de faire le lien entre une exposition à des micropolluants (le mono(2-ethylhexyl) phtalate, un perturbateur endocrinien, et le benzo(a)pyrene, un carcinogène) et ces observations cliniques. Les biomarqueurs de sécrétion hormonale (hPL et hCG hyperglycosylée) et de dégénérescence (activation du purinorécepteur P2X7) que nous avons identifiés permettent de détecter l'exposition et le risque suite à une exposition à des polluants.

Discipline : Toxicologie

Mots-clefs : placenta, *in vitro*, micropolluant, benzo[a]pyrène, phtalate de bis(2-ethylhexyle), perturbateur endocrinien, biomarqueur, hormone placentaire lactogène, hormone chorionique gonadotrope, récepteur P2X7, microenvironnement

Summary: Prenatal exposure to pollutants is commonly evaluated using placenta as a barrier between mother and fetus. Here, we consider placenta as a target organ for toxic agents. To achieve this, we selected a trophoblastic cell model, which is adapted to toxicological studies. In clinical studies, pregnancy pathologies are associated to changes in human placental lactogen (hPL) and human chorionic gonadotropin (hCG) secretions. Our *in vitro* work links exposure to micropollutants (mono(2-ethylhexyl)phthalate, an endocrine disruptor, and benzo(a)pyrene, a carcinogen) and clinical observations. We identified biomarkers of hormonal secretion (hPL and hyperglycosylated hCG) and degeneration (P2X7 receptor activation), which enable the evaluation of exposure and risk attached to exposure to pollutants.

Keywords: placenta, *in vitro*, micropollutant, benzo[a]pyrene, di(2-ethylhexyl) phthalate, endocrine disruptor, biomarker, human placental lactogen, human chorionic gonadotropin, P2X7 receptor, microenvironment

Adresse de l'auteur : 85 rue David Tabakoff, 95190 Goussainville. anais.wakx@free.fr