



HAL
open science

Effets de deux xénohormones, la génistéine et la vinclozoline, sur le développement et les fonctions exocrines et endocrines des glandes salivaires submandibulaires de rats Wistar Han : influence de la période d'exposition en fonction de l'âge et du sexe

Wided Kouidhi Kouidhi-Lamloum

► **To cite this version:**

Wided Kouidhi Kouidhi-Lamloum. Effets de deux xénohormones, la génistéine et la vinclozoline, sur le développement et les fonctions exocrines et endocrines des glandes salivaires submandibulaires de rats Wistar Han : influence de la période d'exposition en fonction de l'âge et du sexe. Sciences agricoles. Université de Bourgogne; Université de Tunis El Manar, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS100 . tel-00935290

HAL Id: tel-00935290

<https://theses.hal.science/tel-00935290>

Submitted on 23 Jan 2014

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.



Cotutelle de thèse
entre



**UNIVERSITE DE TUNIS EL MANAR
FACULTE DES SCIENCES DE TUNIS - DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

et

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT, SANTE/STIC**

THESE
Présentée et soutenue publiquement
par

Mme Wided KOUIDHI-LAMLOUM
Le 19 Décembre 2012

En vue de l'obtention du

DOCTORAT en SCIENCES BIOLOGIQUES

Effets de deux xéno-hormones, la génistéine et la vinclozoline, sur le développement et les fonctions exocrines et endocrines des glandes salivaires submandibulaires de rats Wistar Han: Influence de la période d'exposition en fonction de l'âge et du sexe.

JURY

Président :

Pr. Abderraouf BEN MANSOUR

Faculté de Médecine de Tunis

Rapporteurs :

Dr. Nouredine BOUAICHA

Université Paris Sud 11

Pr. Khemaies BEN RHOUMA

Faculté des Sciences de Bizerte

Examineur :

Pr. Yves ARTUR

Université de Bourgogne Dijon

Directrices de thèse :

Dr. Marie-Chantal Canivenc-Lavier

INRA de Dijon

Pr. Michèle EL MAY

Faculté de Médecine de Tunis



REMERCIEMENTS

Je dédie cette thèse à la mémoire de mon père Ali Kouidhi.

Ce travail de thèse n'aurait pas pu aboutir sans le soutien financier du Ministère de l'enseignement supérieur Tunisien et du Conseil Régional de Bourgogne.

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du Jury, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir juger cette thèse : monsieur Abderraouf Ben Mansour pour avoir accepté d'en être le président, monsieur Khemaies Ben Rhouma et monsieur Noureddine Bouaicha pour avoir accepté d'en être les rapporteurs, monsieur Yves Arthur pour avoir accepté d'en être l'examineur.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, madame Michèle El May, pour l'accueil bienveillant qu'elle m'a accordé au sein de son laboratoire. Je la remercie tout particulièrement pour la confiance qu'elle m'a accordé et ce depuis mon stage pratique de Master, pour son humanité, sa disponibilité. Qu'elle puisse trouver, à travers ce travail le témoignage de ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude à ma co-directrice de thèse, madame Marie-Chantal Canivenc-Lavier pour m'avoir accepté au sein de son équipe et de m'avoir proposé ce sujet de thèse, pour m'avoir communiqué sa passion et de m'avoir appris la réflexion scientifique, pour m'avoir guidé, soutenue dans les moments les plus difficiles et de m'avoir encouragé à aller au bout de mes rêves. Je la remercie particulièrement pour sa générosité, son humanité, pour tous les moments agréables que l'on a passés dans le même bureau pendant près d'une année...

Tout simplement pour cette précieuse amitié qui s'est créée entre nous et qui j'espère se poursuivre au-delà de la thèse. Qu'elle trouve dans ces mots le témoignage de ma grande gratitude.

Je tiens à remercier tout également Raymond Berges, pour m'avoir initié à l'expérimentation animale, pour sa disponibilité et son soutien. Merci aussi à Laurence Decoq, Elise Lalarme, Bruno Paquis pour l'énorme travail réalisé à l'animalerie et pour leur sympathie.

Merci à Chatherine Desmetz, Christine Belloir, Franck Ménétrier je tiens à leurs témoigner toute ma reconnaissance pour leur générosité et leur patience et pour m'avoir appris les techniques nécessaires pour réaliser ce travail.

Je tiens aussi à remercier les techniciens du département d'histologie de la faculté de Médecine de Tunis Bechir Hbecha et Cherif Salhi pour leur aide et aussi Awatef Ben Ammar pour sa sympathie et sa disponibilité.

Merci à Mme Claire Chabanet, biostatisticienne à l'INRA de Dijon pour sa disponibilité et pour son aide précieuse.

Un grand merci à mes amis membres de la faculté de Médecine de Tunis : Afef Nahdi, Imen Hammami et sans oublier Samira Maghraoui pour leur précieuse aide et pour tous les bons moments que l'on a passé ensemble.

Merci aussi Sofiane, Fouzia, Mireille, Maud pour leur conseil, leur sympathie et de m'avoir permis de m'intégrer facilement dans l'UMR à l'INRA de Dijon. Et particulièrement Laurence pour son amitié, sa joie de vivre et de m'avoir épaulé dans les moments les plus difficiles.

Je tiens également à remercier mes amis tunisiens de Dijon je pense à Nizar, Achref, Safa, Asma et Haifa pour leur amitié, leur compatriotisme et les soirées passés ensemble pendant la période de la révolution.

Je remercie tous mes amis rencontrés à Dijon , Helmut, Anne Katherine, Yacine, Claire, Bazile, Siloé, Richard pour tous les bons moments passés ensemble...

Je pense aussi à mes amis Khaoula, Ghada, Aymen, Moez, Yacine, pour leur soutien et leur amitié.

Merci enfin à ma famille ; ma mère Samira, mon frère Selim et ma petite sœur Dorra qui ont été toujours là pour moi et qui ont su m'encourager dans mes choix; pour leur écoute, leur compréhension sans lequel je n'aurais pas pu réaliser ce travail. Je pense aussi à mon oncle Moncef et à ma tante Danielle pour leur énorme soutien, leur implication et leur écoute pendant les périodes où j'étais en France.

A mon cher et tendre époux Mehdi, « un énorme merci pour ta patience, ton écoute, ta compréhension, ton amour tout au long de cette thèse. Sans toi je n'aurais pas tenu. Je crois savoir que tu es content que tout cela s'achève enfin, car maintenant de nouvelles aventures s'annoncent pour nous.... »

Résumé : Les glandes salivaires sont des glandes mixtes : la salive (produit exocrine) est impliquée dans le maintien de l'homéostasie buccale alors que les sécrétions endocrines (ex : facteurs de croissance) ont un rôle physiologique (gamétogénèse, ostéogénèse, hypertension...) Chez les mammifères, elles affichent un dimorphisme sexuel qui laisse entrevoir une sensibilité éventuelle à des xeno-hormones.

Ce mémoire présente l'action de la génistéine (phyto-œstrogène) et/ou de la vinclozoline (anti-androgène) sur la glande submandibulaire (SM) de rat lors d'une exposition précoce via la mère (gestation-lactation) et lors d'une exposition pendant la période de croissance (du sevrage à l'âge adulte). Les glandes SM, prélevées au stade immature et jeune adulte, ont fait l'objet d'une analyse histologique et d'une étude de marqueurs moléculaire des fonctions endocrines et exocrines associées aux processus gustatifs. L'exposition précoce ralentit le développement de la glande SM et augmente sélectivement la préférence au sucré des mâles immatures mais pas des adultes ; l'analyse moléculaire révèle une action sélective sur les fonctions exocrines corrélée à celle sur les préférences, ainsi qu'une action sur les fonctions endocrines (facteurs de croissances) qui s'inverse avec l'âge. L'exposition à partir du sevrage perturbe seulement les mâles qui présentent des altérations des structures sécrétrices couplées à des modifications d'expression des récepteurs hormonaux et facteurs de croissance, mais aussi au taux sérique de l'EGF.

Cette étude identifie la glande submandibulaire comme cible de perturbateurs endocriniens et pose la question des conséquences physiologiques à terme.

Mots clés : Préférence au sucré, Gustine, Cystatine C, Mucine 10, EGF, NGF, TGF, Récepteur Androgène, Récepteur Progestérone, Granular Convolutated Tubule.

Abstract: The salivary glands are mixed glands: saliva (exocrine product) is involved in maintaining oral homeostasis whereas endocrine secretions (eg growth factors) have a physiological role (gametogenesis, osteogenesis, hypertension ..). In mammals, they display sexual dimorphism suggesting a possible susceptibility to xeno-hormones.

This manuscript presents the action of genistein (phytoestrogen) and/or vinclozolin (anti-androgenic) on the submandibular gland (SM) rats when performing an early exposure via the mother (pregnancy, lactation) or an exposure during the growth period (from weaning to adulthood). The SM glands, collected at immature and young adult ages, have been analyzed according histological aspect and expression of molecular markers of endocrine and exocrine functions associated with gustatory process. The early exposure disrupted the development of the SM gland and selectively increases the sweet preference in immature males but not in adults; molecular analysis reveals a selective action on exocrine functions related to the sweet preferences and also an action on endocrine functions (growth factors) which reverses with age. Exposure from weaning disrupts only the male salivary glands with alterations in secretory structures coupled with changes in expression of both, sex-hormone receptors and growth factors, but also in serum EGF.

This study identifies the submandibular gland as a target for endocrine disruptors and raises the question of the further physiological consequences.

Keywords: Sweet Preference, Gustine, Cystatin C, Mucin 10, EGF, NGF, TGF, Androgen Receptor, Progesterone Receptor, Granular Convolutated Tubule.

Liste des Abréviations

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

Ag : Antigène

AgRP: Agouti-Related Peptide

AhR: Aryl hydrocarbon Receptor

AR : Androgen Receptor

ARNm: Acide ribonucléique messenger

BPA: Bisphenol A

CA 6: Carbonic Anhydrase 6

CCK : Cholécystokinine

CRF : Corticolibérine

CRF : Corticolibérine

CTRL : Contrôle

DAB : 3-3', diaminobenzidine

DBD : DNA Binding Domain

DDE : Dichlorodiphenyldichloroethylene

DDT : Dichlorodiphényltrichloroethane

DES : Diethylstilbestrol

DHEA : Dihydroépiandrostérone

EGF : Epidermal Growth Factor/ Facteur de Croissance Epidermique

ELISA : Enzym Linked Immunosorbent Assay / Titrage immunoenzymatique utilisant un antigène absorbé

EOPS : Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques

ER : Estrogen Receptor/ Récepteur des œstrogènes

FSH: Follicle-stimulating Hormone /hormone folliculo-stimulante

GCT : Granular Convolved Tubule/ Tubule granulaire Contourné

GEN : Génistéine

GH : Growth Hormone/ Hormone de croissance

GH-IH: Somatostatine

GH-RH : Somatocrine

GnRH : Gonadotropin / Gonadolibérine

HCG : Human Chorionic Gonadotropin

HGF : Haptic Growth Factor/ Facteur de Croissance Hépatique
HSP : Heat-shock protein/ protéines de choc thermique
IgA: Immunoglobuline A
IGF: Insulin like Growth Factor
KLK : Kallitréines
LH : Luteinizing hormone /hormone lutéinisante
MUC 10 : Mucine 10
NPY : Neuropeptide Y
OCT: Optimal Cutting Temperature
Pb: Paire de bases
PBC : Polychlorobiphényles
pc : poids corporel
PCR : Polymerase Chain Reaction
PE : Perturbateur Endocrinien
PR : Progesterone Receptor/ Récepteur de la Progestérone
PRP : Protein Rich Prolin
RPS 9 : Ribosomal Protein S9/ Protéine Ribosomale S9
RT : Reverse Transcription/ Transcription Reverse
SE : Système Endocrinien
SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator / Modulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes
SM : Submandibulaire
SNC : Système Nerveux Central
TBT: Tributylétain
TCDD: 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine
TGF: Transforming Growth Factor
TRH : Thyrolibérine
TSH : Thyrotrophine
VIN: Vinclozoline
YES : Yeast Estrogen Screen

Liste des Figures

Figure 1 : A. Localisation des glandes salivaires chez l'homme. B. Localisation des trois glandes salivaires majeures chez le rat.....	5
Figure 2 : Localisation des glandes mineures au niveau des papilles gustatives.....	6
Figure 3 : Innervation des glandes salivaires.....	7
Figure 4 : Schéma d'un adénomère salivaire.....	9
Figure 5 : Coupes histologiques de glandes salivaires majeures chez l'homme : A. glande parotide ; B. glande submandibulaire ; C. glande sublinguale.....	10
Figure 6 : Schéma d'un adénomère salivaire submandibulaire de rongeur.....	11
Figure 7 : Comparaison histologique entre la glande submandibulaire de l'homme (A) et la glande submandibulaire de rat (B) ; GCT : Granular convoluted tubule ou tubule granulaire contourné.....	11
Figure 8 : Schéma représentant les stades de développement de la glande salivaire submandibulaire.....	13
Figure 9 : Morphogenèse par ramification de la glande submandibulaire en culture in vivo et en ex vivo (chez la souris) ; <i>la SM de souris a été isolée au 12ème jour embryonnaire M= mésenchyme, E= épithélium ; les flèches désignent l'approfondissement des invaginations</i>	13
Figure 10 : Schéma du développement postnatal de la glande submandibulaire chez les rongeurs.....	14
Figure 11 : Schéma représentant la production de la salive.....	16

Figure 12 : Les principaux rôles de la salive.....	24
Figure 13 : Réduction du débit salivaire avec l'âge.....	36
Figure 14 : Modification de la composition salivaire avec l'âge.....	36
Figure 15 : Schéma du système endocrinien.....	44
Figure 16 : Différents mode de sécrétion des hormones stéroïdes.....	46
Figure 17 : Gouvernance de l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	47
Figure 18 : Hypothalamus et contrôle endocrinien du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire.....	52
Figure 19 : Biosynthèse des hormones stéroïdes.....	54
Figure 20 : Cycle menstruel chez la femme.....	56
Figure 21 : Hormones sexuelles au cours de la gestation et à la naissance.....	57
Figure 22 : Voie de signalisation génomique et non génomique des hormones Stéroïdiennes.....	59
Figure 23 : Comparaison des structures de gènes des récepteurs aux œstrogènes, aux androgènes et à la progestérone.....	60
Figure 24: Organes exprimant les récepteurs des œstrogènes.....	61
Figure 25 : Changements relatifs des hormones sexuelles au cours de la vie.....	63
Figure 26 : Relation dose-réponse.....	71
Figure 27 : Les différentes relations dose effets.....	71
Figure 28 : Effets de composés oestrogéniques (perturbateurs endocriniens) mesurés par le test YES.....	73

Figure 29 : Structures chimiques de quelques phytoestrogènes comparées à celle de l'œstradiol.....	74
Figure 31: Structure chimique de la vinclozoline.....	80
Figure 32: schéma de l'hydrolyse de la vinclozoline en milieu aqueux.....	81
Figure 33: Protocole expérimentale de l'exposition gestationnelle et lactationnelle.....	93
Figure 34: Mesure de la distance anogénitale (DAG) chez le mâle (M) et chez la femelle (F).....	94
Figure 35 : Détermination de l'âge de la puberté par l'observation de l'ouverture vaginale (A) et de la séparation du prépuce (B).....	94
Figure 36 : Protocole expérimentale de l'exposition directe adulte.	96
Figure 37 : Principe de la technique d'immunohistochimie.....	98
Figure 38 : Principe du test ELISA en« sandwich ».....	100
Figure 39: Protocole expérimental établi pour l'analyse de l'expression des ARNm	101
Figure 40 : Schéma d'une puce utilisée pour l'analyse de la qualité des ARN.....	103
Figure 41 : Gel virtuel fourni par l'électrode automatisée de la puce de l'Experion™.....	103
Figure 42 : Courbe théorique de l'intensité du signal émis en fonction du nombre de cycles lors d'une PCR en temps réel.....	106
Figure 43 : Nombre de noyaux marqués par le Ki-67 au niveau des glandes SM au stade J25 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).....	116
Figure 44: Concentration de l'EGF sérique circulant chez les mâles au stade J25 (A) et au stade J100 (B) suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).....	117

Figure 45 : Consommation de la solution de saccharine à 0.3% (A) et d'eau (B) et évaluation du ratio de préférence (C) chez les femelles au stade J35 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).....	121
Figure 46: Concentration de l'EGF sérique circulant chez les femelles au stade J35 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).....	122
Figure 47 : Coupes histologiques et résultats morphométriques des glandes submandibulaire de femelles au stade J50 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).....	124
Figure 48 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN) sur l'expression des récepteurs hormonaux (A, B, C) et des facteurs de croissance (D, E, F) au niveau de la glande submandibulaire des rats femelles au stade J50.....	126
Figure 49: Consommation de la solution de saccharine à 0.3% (A) et d'eau (B) et évaluation du ratio de préférence (C) chez les femelles au stade J50 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).....	127
Figure 50: Concentration de l'EGF sérique circulant chez les femelles au stade J50 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).....	128
Figure 51: Récapitulatif de l'exposition gestationnelle et lactationnelle.....	132
Figure 52 : Coupes histologiques et résultats morphométriques des glandes submandibulaire de rats mâles au stade adulte J100 suite à l'exposition directe du sevrage à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).....	136
Figure 53 : Effet de l'exposition directe du sevrage à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN) sur l'expression des récepteurs	

hormonaux (A, B) et des facteurs de croissance (C,D) au niveau de la glande submandibulaire des rats mâles au stade J100.....137

Figure 54 : Consommation de la solution de saccharine à 0.3% (A) et d'eau (B) et évaluation du ratio de préférence (C) chez les mâles au stade J100 directe du sevrage jusqu'à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN)....138

Figure 55 : Concentration de l'EGF sérique circulant chez les mâles au stade J100 suite à l'exposition directe du sevrage jusqu'à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).....139

Figure 56 : Coupes histologiques et résultats morphométriques des glandes submandibulaire de femelles au stade J50 suite à l'exposition gestationnelle et lactationelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).....141

Figure 57 : Effet de l'exposition directe du sevrage à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN) sur l'expression des récepteurs hormonaux (A, B) et des facteurs de croissance (C,D) au niveau de la glande submandibulaire des rats femelles au stade J100.....142

Figure 58 : Consommation de la solution de saccharine à 0.3% (A) et d'eau (B) et évaluation du ratio de préférence (C) chez les femelles au stade J100 directe du sevrage jusqu'à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN)....143

Figure 59 : Concentration de l'EGF sérique circulant chez les femelles au stade J100 suite à l'exposition directe du sevrage jusqu'à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).....144

Figure 60 : Récapitulatif de l'exposition directe du sevrage à l'âge adulte.....146

Liste des Tableaux

Tableau I : Variation des pourcentages de sécrétion salivaire des glandes majeures au cours de différentes situations chez l'homme.....	16
Tableau II : Composition ionique de la salive humaine.....	18
Tableau III : Principaux perturbateurs endocriniens hormis les hormones naturelles.....	66
Tableau IV : Classification structurale des phytoestrogènes.....	74
Tableau V : Séquences des paires d'amorces oligonucléotidiques utilisées.....	105
Tableau VI : Programme de la PCR temps réel.....	107
Tableau VII : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle sur les paramètres de développement des femelles J50.....	123
Tableau VIII : Effet de l'exposition directe à la génistéine et /ou à la vinclozoline sur le poids corporel relatif et le poids des glandes SM des mâles J100.....	134
Tableau IX: Effet de l'exposition directe à la génistéine et /ou à la vinclozoline sur le poids corporel relatif et le poids des glandes SM des femelles J100.....	139

Table des Matières

<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	<i>1</i>
<i>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	<i>3</i>
Chapitre 1 Les glandes salivaires	4
1. Introduction.....	4
2. Anatomie, histologie et embryogénèse	4
2.1. Classification des glandes salivaires	4
2.1.1. Les glandes salivaires majeures	5
2.1.2. Les glandes salivaires « mineures » ou « accessoires ».....	6
2.2. Vascularisation	7
2.3. Innervation	7
2.4. Histologie et structures sécrétrices.....	8
2.4.1. Structure de l'adénomère.....	8
2.4.2. Classification des acini et spécificités fonctionnelles.....	9
2.4.3. Particularités structurales chez le rongeur.....	10
2.5. Embryogénèse et développement	12
2.5.1. Origine embryonnaire	12
2.5.2. Développement prénatal	12
2.5.3. Développement post-natal.....	14
3. Fonctions sécrétrices des glandes salivaires.....	15
3.1. Fonction exocrine et production de la salive.....	15
3.1.1. Elaboration de la salive.....	15
3.1.2. Produits de la salive intrinsèques aux glandes salivaires.....	17
3.1.2.1. Les électrolytes (éléments minéraux).....	17
3.1.2.2. Les glycoprotéines.....	18
3.1.2.3. Les protéines enzymatiques.....	19
3.1.3. Produits de la salive extrinsèques aux sécrétions salivaires.....	22
3.1.3.1. Protéines exogènes et/ou résiduelles.....	22
3.1.3.2. Résidus chimiques d'origine alimentaire	22
3.1.3.3. Déchets buccaux.....	23
3.1.3.4. Agents pathogènes	23
3.1.4. Rôles de la salive.....	23
3.1.4.1. Maintien de l'homéostasie buccale.....	24

3.1.4.2.	Solubilisation du bol alimentaire.....	25
3.1.4.3.	Perceptions gustatives et autres perceptions sensorielles	26
3.2.	Fonction endocrine des glandes salivaires : les peptides	
« biologiquement actifs »	27
3.2.1.	Les facteurs de croissance.....	27
3.2.1.1.	L'Epidermal Growth Factor (EGF).....	27
3.2.1.2.	Le Nerve Growth Factor (NGF).....	28
3.2.1.3.	Les Transforming Growth Factors (TGF α et β).....	28
3.2.1.4.	L'insuline-like Growth Factor I (IGF-1).....	29
3.2.1.5.	Autres.....	29
3.2.2.	Les kallibréines (KLK).....	30
3.2.3.	Régulateurs du comportement alimentaire	31
3.2.3.1.	La leptine	31
3.2.3.2.	Le NPY.....	31
4.	Régulation hormonale des glandes salivaires	31
4.1.	Expression de récepteurs hormonaux	31
4.2.	Dimorphisme sexuel.....	32
4.3.	Morphogenèse et plasticité structurale de la glande SM.....	33
4.4.	Débit salivaire et sécrétions exocrines.....	34
4.4.1.	Influence du statut hormonal.....	34
4.4.1.1.	Dimorphisme sexuel	34
4.4.1.2.	Cycle menstruel et gestation.....	35
4.4.1.3.	La sénescence.....	35
4.4.2.	Influence de facteurs exogènes.....	37
4.4.2.1.	Mastication et stimuli physiques ou sensoriels.....	37
4.4.2.2.	Radiothérapie	37
4.4.2.3.	Médicaments.....	38
4.4.2.4.	Stress et émotions	39
4.4.3.	Influence de certaines pathologies	39
4.4.3.1.	Syndrome de Gougerot-Sjögren	39
4.4.3.2.	Pathologies métaboliques	40
4.4.3.3.	Maladies infectieuses.....	40
4.5.	Fonctions endocrines	41
4.6.	Conséquences physiologiques de l'ablation de la glande SM..	41
4.6.1.	Développement de la glande mammaire et lactation	41
4.6.2.	Gamétogenèse et reproduction masculine.....	42

4.6.3.	Conséquences sur d'autres organes périphériques.....	42
5.	Questionnement Scientifique	43
	Chapitre 2 La perturbation endocrinienne.....	44
1.	Système endocrinien.....	44
1.1.	Classification des hormones.....	45
1.2.	Mode de sécrétion des hormones.....	45
1.3.	Gouvernance de l'axe hypothalamo-hypophysaire	46
1.3.1.	L'épiphyse ou glande pinéale.....	46
1.3.2.	L'hypothalamus	47
1.3.3.	L'hypophyse	48
1.3.4.	Les hormones thyroïdiennes.....	50
1.3.5.	Les hormones surrénaliennes.....	50
1.3.6.	Les hormones gonadiques ou sexuelles.....	51
1.4.	Hypothalamus et métabolisme énergétique.....	52
2.	Les hormones sexuelles stéroïdiennes.....	53
2.1.	Biosynthèse et métabolisme	53
2.1.1.	Les hormones femelles.....	54
2.1.1.1.	Les œstrogènes.....	54
2.1.1.2.	La progestérone	56
2.1.1.3.	Les hormones de gestation.....	56
2.1.2.	Les hormones mâles.....	57
2.2.	Mécanisme d'action.....	58
2.2.1.	Voie génomique.....	58
2.2.2.	Voie non génomique	58
2.3.	Les récepteurs nucléaires	59
2.3.1.	Les récepteurs des œstrogènes (ER).....	59
2.3.2.	Les récepteurs de la progestérone	61
2.3.3.	Les récepteurs des androgènes.....	62
2.4.	Effets pléiotropes des hormones sexuelles.....	62
3.	Perturbateurs endocriniens ou Xeno-hormones	64
3.1.	Définitions	64
3.2.	Modes d'action	66
3.2.1.	Interactions directes avec les récepteurs hormonaux.....	66
3.2.1.1.	Action agoniste	66
3.2.1.2.	Action antagoniste	67

3.2.2.	Interactions indirectes avec le système endocrinien.....	67
3.2.2.1.	Modification de la concentration en hormone.....	67
3.2.2.2.	Modification de la concentration en récepteurs.....	68
3.3.	Constats de perturbation endocrinienne.....	68
3.3.1.	Constats au niveau de la faune	68
3.3.2.	Constats chez l'homme.....	69
3.4.	Evaluation du risque pour l'homme.....	70
3.4.1.	Nouveau dogme toxicologique (effets en U)	70
3.4.2.	Effet des mélanges	72
3.5.	La Génistéine et autres phytoestrogènes	73
3.5.1.	Voies d'exposition et métabolisme	75
3.5.2.	Propriétés œstrogéniques	76
3.5.3.	Effets physiologiques	77
3.5.3.1.	Effets sur les troubles liés à la ménopause.....	77
3.5.3.2.	Effets sur la fertilité et la reproduction	77
3.5.3.3.	Effets sur la cancérogenèse	78
3.5.3.4.	Effets sur le comportement	79
3.6.	La vinclozoline.....	79
3.6.1.	Voies d'exposition et métabolisme	81
3.6.2.	Propriétés anti-androgéniques.....	82
3.6.3.	Effets physiologiques	82
3.6.3.1.	Effets sur la fertilité et la reproduction	82
3.6.3.2.	Effets sur la cancérogenèse	84
3.6.3.3.	Effets sur le comportement	85
3.7.	Mélange génistéine vinclozoline	85
	<i>Contexte et objectifs de la thèse</i>	<i>86</i>
	 <i>MATERIELS ET METHODES</i>	<i>90</i>
1.	Matériel biologique	91
2.	Produits et réactifs chimiques.....	91
2.1.	Molécules étudiées.....	91
2.2.	Réactifs d'histologie et d'immunohistochimie	91
2.3.	Produits de biologie moléculaire	92
2.4.	Réactif du dosage ELISA de l'EGF sérique	92
3.	Traitement des animaux.....	92

3.1.	Exposition gestationnelle et lactationnelle	92
3.1.1.	Suivi expérimental.....	92
3.1.2.	Paramètres mesurés en cours d'expérimentation	93
3.1.3.	Sacrifices et prélèvements.....	94
3.2.	Exposition directe du sevrage jusqu'à l'âge adulte	95
3.2.1.	Modalités d'exposition	95
4.	Test de préférence au sucré	96
5.	Les paramètres histologiques	97
5.1.	Coloration Trichrome de Masson variante vert lumière et comptages histologiques.....	97
5.2.	Immunohistochimie (Ki-67).....	98
6.	Dosage ELISA de l'EGF sérique	99
7.	Expression des ARNm par PCR relative en temps réel.....	101
7.1.	Extraction des ARN totaux	102
7.2.	Dosage et vérification de la bonne qualité des ARN totaux	102
7.3.	Traitement à la DNase	104
7.4.	Réaction de transcription inverse (RT).....	104
7.5.	PCR relative en temps réel	104
7.6.	Analyse des gènes cible par le calcul de l'expression relative d'ARNm.....	107
8.	Analyse statistique	108

RESULTATS 109

1.Etude 1 : Effet d'une exposition précoce (gestation-lactation).....	110
1.1. Effets chez des rats mâles au stade immature (J25) et adultes (J100).....	111
1.1.1. Effet sur la préférence au sucré et sur le développement des glandes submandibulaires (Publication 1):	111
"Perinatal exposure to xenoestrogens impacts sweet preference and submandibular development in male rats"	
1.1.1.1. Croissance et développement corporel	112
1.1.1.2. Préférence au sucré	112
1.1.1.3. Morphométrie de la glande SM	112
1.1.1.4. Expression des ARNm codant pour les récepteurs hormonaux....	113
1.1.1.5. Expression des ARNm codant pour les facteurs de croissance....	114

1.1.1.6.	Expression des protéines salivaires gustatives.....	114
1.1.2.	Résultats complémentaires (non présentés au niveau de la publication)	115
1.1.2.1.	Prolifération cellulaire	115
1.1.2.2.	EGF sérique	116
1.2.	Effets chez la femelle au stade prépubère J35.....	118
1.2.1.	Effets sur le développement des glandes SM (publication 2) .	118
	“In Utero and Lactational Exposure to Low-Dose Genistein-Vinclozolin Mixture Affects the Development and Growth Factors mRNA Expressions of the Submandibular Salivary Gland in Immature Female Rats”.	
1.2.1.1.	Croissance et développement corporel	119
1.2.1.2.	Morphométrie de la glande SM.....	119
1.2.1.3.	Prolifération cellulaire	120
1.2.1.4.	Expression des ARNm codant pour les récepteurs hormonaux et les facteurs de croissance	120
1.2.1.5.	Expression des ARNm codant pour les facteurs de croissance....	120
1.2.2.	Résultats complémentaires (non présentés au niveau de la publication)	121
1.2.2.1.	Préférence au sucré	121
1.2.2.2.	EGF sérique	121
1.3.	Effets chez les femelles en fin de puberté (J50)	122
1.3.1.	Croissance et développement général	122
1.3.2.	Morphométrie de la glande SM.....	123
1.3.3.	Expression des ARNm codant pour les récepteurs hormonaux.....	125
1.3.4.	Expression des ARNm codant pour les facteurs de croissance	125
1.3.5.	Préférence au sucré	127
1.3.6.	EGF sérique	127
1.4.	Discussion.....	129
2.	Etude 2 : Effets d'une exposition du sevrage à l'âge adulte	134
1.1.	Chez les rats mâles (J100).....	134
1.1.1.	Croissance et développement général.....	134
1.1.2.	Morphométrie de la glande SM.....	135

1.1.3.	Expression des ARNm codant pour les récepteurs hormonaux.....	135
1.1.4.	Expression des ARNm codant pour les facteurs de croissance.....	137
1.1.5.	Préférence au sucré	138
1.1.6.	Dosage de l'EGF	138
1.2.	Effets chez les rats femelles (J100).....	139
1.2.1.	Croissance et développement général	139
1.2.2.	Morphométrie de la glande SM	140
1.2.3.	Expression des ARNm codant pour les récepteurs hormonaux.....	140
1.2.4.	Expression des ARNm codant pour les facteurs de croissance.....	142
1.2.5.	Préférence au sucré	143
1.2.6.	EGF sérique	143
1.3.	Discussion.....	144

<i>DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION</i>	<i>147</i>
--	------------

<i>PERSPECTIVES</i>	<i>151</i>
---------------------------	------------

<i>ANNEXES</i>	<i>153</i>
----------------------	------------

<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	<i>157</i>
--	------------

***INTRODUCTION
GENERALE***

INTRODUCTION GENERALE

Le système endocrinien agit comme un chef d'orchestre pour coordonner la formation des organes et la mise en place des grandes fonctions physiologiques dès les premiers jours de la conception jusqu'à la fin de notre vie. Il est en relation étroite avec notre cerveau pour maintenir notre corps dans un état d'équilibre physiologique sain et lui permettre de réagir à différents évènements de la vie, comme la grossesse ou le vieillissement, mais aussi aux divers évènements occasionnés par notre environnement ou notre mode de vie (stress, émotions, changements de rythmes, etc....)

Les glandes salivaires sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et contribuent aussi au maintien de l'équilibre de l'homéostasie. Leurs fonctions exocrines (salive) leur confèrent un rôle essentiel dans les premiers processus digestifs, mais aussi comportementaux (perception gustatives et phéromonales). De plus, par leurs fonctions endocrines, elles libèrent en permanence divers composés dans la circulation sanguine comme des facteurs de croissance, des kallitréines, qui sont en mesure d'exercer un contrôle sur tout l'organisme. Ainsi, les facteurs de croissance sont impliqués dans des mécanismes de régulation, tant au niveau local - épithélium buccal, morphogénèse des bourgeons gustatifs (EGF), perceptions gustatives (NGF) - que systémique - gonades, glandes mammaires, épithéliums glandulaires (EGF). Les glandes salivaires sont donc étroitement liées aux phénomènes de reproduction et de comportement.

Chez les mammifères, les glandes salivaires présentent un dimorphisme sexuel qui traduit bien le rôle des hormones stéroïdiennes, notamment des œstrogènes et des androgènes, dans leur développement et leurs fonctions. Aussi, un déséquilibre du statut hormonal consécutif à un apport d'hormones ou à une exposition en composés de type « perturbateur endocrinien », au vu des différentes fonctions physiologiques contrôlées par les glandes salivaires, pourrait avoir des impacts négatifs importants sur le développement de nombreux épithéliums qui tapissent et régulent l'organisme, sur le comportement alimentaire (mauvaise perception du goût), social (stress, émotions) et sexuel (perception des phéromones, reproduction, lactation), les troubles de la digestion et du système immunitaire voire même des impacts plus délétères sur le développement (ossification, dentition).

Notre alimentation et notre environnement nous exposent à divers composés chimiques (migrants d'emballage, polluants, pesticides) ou biologiques (phytoestrogènes) à notre insu, substances qui sont capables de mimer l'action des hormones ou d'en modifier la biodisponibilité. Face au déclin de la fertilité et à l'augmentation de pathologies hormono-dépendantes (cancers, obésité...) observées chez l'homme vivant dans les pays

industrialisés ou les zones polluées, l'exposition à ces perturbateurs endocriniens est devenue un vrai problème de santé publique. Au cours des quinze dernières années, un nombre croissant d'études expérimentales réalisées chez le rat exposé à des composés de type oestrogénique ou anti-androgénique, rapporte des modifications variées du développement de plusieurs organes et des anomalies du comportement (social, sexuel, et alimentaire) en particulier lors d'expositions néonatales. Ces modifications deviennent patentées à partir de doses compatibles avec des expositions environnementales (de l'ordre du µg ou du mg/kg/j) inférieures aux doses couramment admises comme sans effets. Ces études sur les effets des perturbateurs endocriniens ont été longtemps consacrées à des cibles bien précises du système endocrinien, des cibles « classiques » c'est-à-dire ayant un rapport direct avec le système endocrinien.

Etant donné que les glandes salivaires sont en liaison étroite à la fois avec les organes reproducteurs et avec le comportement, il nous a paru intéressant de déterminer l'impact de perturbateurs endocriniens sur les glandes salivaires à des doses qui entraînent des modifications au niveau des organes sexuels, de la glande mammaire, et du comportement alimentaire (préférences gustatives). Pour cela, nous avons sélectionné deux molécules dont les effets toxiques pour la reproduction et le développement sont déjà bien décrits : la génistéine, un phyto-œstrogène présent dans le soja, et la vinclozoline, un fongicide à effet anti-androgénique. Ce mémoire vise à définir l'impact de la fenêtre d'exposition à ces deux composés, administrés seuls ou en mélange, sur la glande submandibulaire de rat.

***SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE***

Chapitre 1 Les glandes salivaires

1. Introduction

Les glandes salivaires sont des organes communs à tous les animaux, vertébrés ou invertébrés. Elles ont été très étudiées chez les animaux pour lesquels la salive joue un rôle important, en particulier chez les insectes, où elles sont fortement impliquées dans la perception des phéromones ou dans la transmission de maladies (ex : parasite du sommeil). Chez les vertébrés, la salive est connue comme vecteur de transmission de virus (virus de la rage, HIV), mais aussi pour ses effets toxiques résultant de la présence de protéines venimeuses sécrétées par les glandes salivaires (serpents, chauve-souris). La salive peut également avoir un rôle bénéfique, et dans l'antiquité, bon nombre de soins passaient par l'utilisation de la salive car on lui attribuait des vertus désinfectantes et cicatrisantes. Les études menées chez les mammifères ont pu relier ces effets bénéfiques à la présence dans la salive de peptides biologiquement actifs sécrétés par les glandes salivaires. Elles ont montré leur rôle fondamental dans le maintien de la santé buccale et gastro-intestinale, mais aussi dans de nombreux processus physiologiques associés au développement et au comportement.

Ce chapitre a pour objectif de rappeler quelques éléments d'anatomie et de physiologie sur les glandes salivaires chez les mammifères et de préciser l'état des connaissances sur une des glandes principales : la glande submandibulaire. Celle-ci a été très étudiée chez le rongeur, probablement parce qu'elle est facilement accessible, bien individualisée et visible à l'œil nu. Elle présente un intérêt particulier pour étudier les effets de perturbateurs endocriniens car elle est dotée d'un dimorphisme sexuel bien marqué, surtout chez les rongeurs, et sécrète une large quantité de peptides biologiquement actifs qui peuvent passer directement dans la circulation sanguine, et pour lesquels des effets sur les processus de reproduction de développement et de comportement sont bien décrits.

2. Anatomie, histologie et embryogénèse

2.1. Classification des glandes salivaires

Chez les mammifères, Les glandes salivaires sont classées en deux catégories : les glandes salivaires dites « principales » ou « majeures », qui sont au nombre de trois paires: les glandes parotides, sous-maxillaires ou submandibulaires et sublinguales et les glandes salivaires mineures, qui sont très petites et les plus nombreuses.

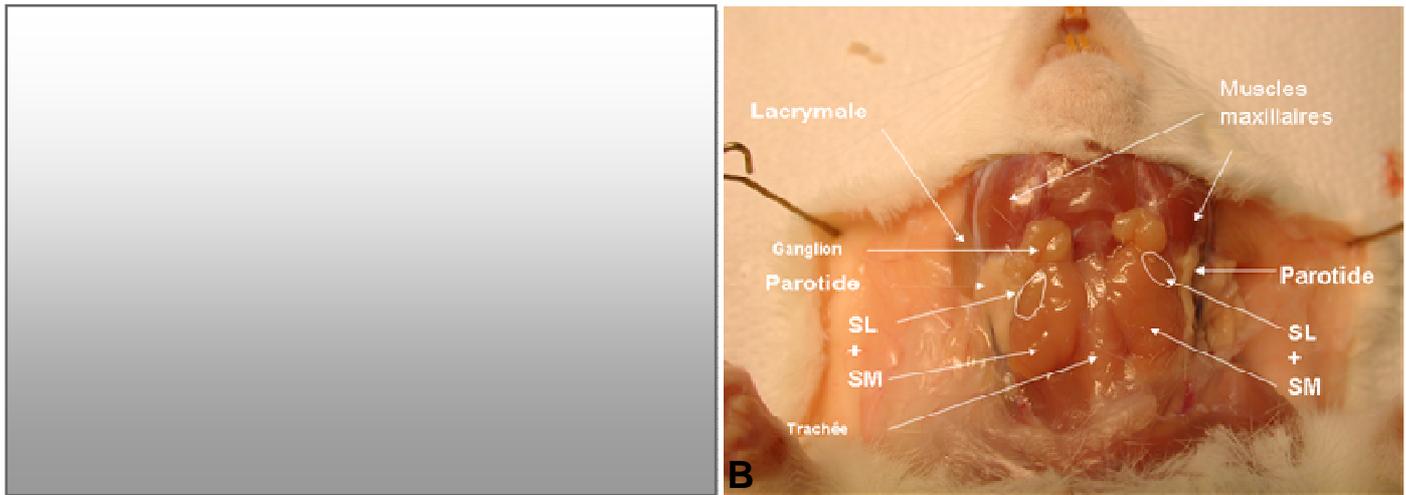


Figure 1 : A. Localisation des glandes salivaires chez l'homme (<http://www.futura-sciences.com>). B. Localisation des trois glandes salivaires majeures chez le rat.

2.1.1. Les glandes salivaires majeures

Les glandes salivaires majeures se distinguent par leur forme, leur position dans la cavité buccale, et la nature de leurs sécrétions.

- **La glande parotide** est la plus importante en volume. Elle présente une forme irrégulière adaptée à la dépression qui s'interpose entre la branche montante de la mandibule et l'os temporal. Son produit de sécrétion se déverse par le canal de Sténon dans la bouche au niveau de la deuxième molaire de la mâchoire supérieure.

- **La glande sublinguale** est la moins volumineuse. Chez l'homme, elle est en forme d'amande et repose sur le plancher buccal. De nombreux petits conduits sublinguaux (canaux de Rivinus et de Wather) s'ouvrent à la surface de la bouche.

- **La glande submandibulaire** (ou sous-maxillaire) se situe sous l'angle de la mandibule. La sécrétion qu'elle déverse sous la langue transite par le canal de Wharton.

Chez l'homme, (Figure 1A) la parotide est située sur le côté près de l'oreille ; elle pèse environ 25 g, et entre profondément en contact avec la partie postérieure de la submandibulaire. La sublinguale est anatomiquement isolée des deux autres glandes et se situe sous la langue, d'où son nom. La sublinguale communique tout de même avec la submandibulaire par le conduit submandibulaire qui adhère à la face médiale de la sublinguale où il y reçoit un volumineux conduit accessoire émergeant de la partie inférieure de celle-ci (Moore et Dalley, 1999). Son poids est un peu plus faible que celui de la sous-maxillaire (moins de 5 g).

Chez les rongeurs, (Figure 1B) les glandes salivaires majeures sont juxtaposées à la trachée. La sublinguale est très petite, pas plus grosse qu'une lentille, et pèse environ 25 mg chez un rat adulte. Contrairement à l'homme, elle est collée à la submandibulaire (environ 200mg), donnant l'impression d'une seule et même glande. La parotide est insérée dans une masse grasseuse et bien individualisée sur les côtés, près de l'oreille et des glandes lacrymales. Son poids chez le rat adulte est d'environ 300mg.

2.1.2. Les glandes salivaires « mineures » ou « accessoires »

Les glandes salivaires mineures sont aussi appelées glandes de Von Ebner. Elles sont organisées en amas cellulaires et disséminées sur toute la surface de la muqueuse buccale, excepté au niveau des gencives et du vermillon des lèvres. Leur présence et leur position sont variables en fonction des individus ; elles secrètent une quantité de salive négligeable par rapport au volume total salivaire (Vidailhet 2000), Elles sont aussi présentes sur la langue, à proximité des bourgeons gustatifs (Figure 2). Nous n'avons pas trouvé de données quant à la présence d'un dimorphisme sexuel ou tout autre lien avec le système endocrinien : elles ne font donc pas l'objet d'une analyse bibliographique approfondie dans ce chapitre.



<http://www.tulane.edu/~histolab/GIlab/Slide1Did.htm>

Figure 2 : Localisation des glandes mineures au niveau des papilles gustatives

2.2. Vascularisation

Les glandes salivaires sont desservies par les branches de la carotide externe. Les glandes submandibulaires sont vascularisées par les artères linguales et les artères faciales ; les glandes sublinguales sont irriguées par les artères sublinguales (branche de l'artère linguale) et les artères sous-mentales (branche de l'artère faciale) ; quant aux glandes parotides seules les artères faciales les vascularisent. Les artérioles se ramifient le long des canaux et forment, au niveau des canaux striés, un premier plexus capillaire. Le sang artériel est ensuite drainé vers les acini où un second plexus vasculaire permet les échanges ioniques. Le retour veineux se fait, pour les glandes submandibulaires et sublinguales, par les veines faciales et les veines jugulaires internes, et par les veines jugulaires pour les glandes parotides.

2.3. Innervation

La sécrétion de salive est un réflexe et la glande salivaire reçoit des stimuli des centres médullaires (Figure 3). Le contrôle de la sécrétion salivaire est sous la dépendance des deux divisions du système nerveux autonome, les voies ortho- et parasympathique. Si ces deux systèmes déclenchent habituellement des effets physiologiques antagonistes au niveau des organes qu'ils innervent, leur action est complémentaire au niveau des glandes salivaires. Le système parasympathique, dont l'acétylcholine est le principal médiateur, intervient plus spécifiquement sur les sécrétions des acini, tandis que les nerfs provenant du système orthosympathique agissent via la libération de noradrénaline sur les sécrétions des acini, mais aussi sur les canaux. D'autres neuropeptides sont également libérés pour entraîner la vasodilatation des vaisseaux sanguins qui accompagnent le processus sécrétoire (Proctor et Carpenter, 2007).

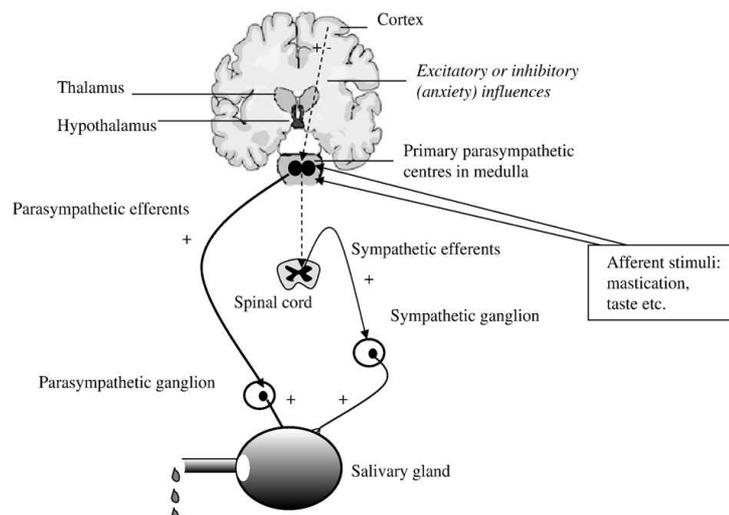


Figure 3 : Innervation des glandes salivaires selon Proctor et Carpenter (2007).

Chaque glande est dotée d'un système d'innervation propre. L'innervation de la glande parotide provient du nerf auriculo-temporal, qui véhicule les fibres parasymphatiques sécrétoires post-ganglionnaires otiques. Les fibres pré-ganglionnaires véhiculées par le nerf glossopharyngien (IX) gagnent le ganglion otique via le plexus tympanique et le nerf petit pétreux. Les nerfs sympathiques proviennent du plexus carotidien externe. L'innervation de la glande submandibulaire provient du nerf lingual par l'intermédiaire du ganglion submandibulaire et celle de la glande sublinguale provient du nerf lingual par l'intermédiaire du nœud sublingual.

2.4. Histologie et structures sécrétrices

2.4.1. Structure de l'adénomère

Les glandes salivaires, comme la glande mammaire et la plupart des glandes exocrines, sont enfermées dans une capsule conjonctive fibreuse et se divisent en lobules. Les vaisseaux sanguins et les nerfs pénètrent dans la glande par le hile et se ramifient dans les lobules. L'unité sécrétrice du parenchyme lobulaire est l'adénomère (Figure 4). Il est constitué de cellules sécrétrices formant des agglomérats creux dénommés, selon leur forme, acini ou tubulo-acini, dont la cavité (le lumen) se prolonge par un canal intercalaire. Les canaux intercalaires sont des petits tubes qui sont formés par un épithélium pavimenteux simple et qui recueillent la salive des acini. Les canaux intercalaires de plusieurs acini se réunissent pour former des canaux intralobulaires striés, bordés d'un épithélium prismatique simple à pseudostratifié. Chaque canal strié déverse les sécrétions du lobule dont il est issu dans le canal interlobulaire qui circule dans les cloisons interlobulaires. Le canal interlobulaire constitue le canal excréteur de la glande salivaire et débouche dans la cavité buccale. Entourant chaque adénomère, les cellules myoépithéliales sont similaires en tous points aux cellules musculaires lisses. Contractiles, elles joueraient un rôle dans l'expulsion des produits de sécrétion.



Figure 4 : Schéma d'un adénomère salivaire (www-rocq.inria.fr)

2.4.2. Classification des acini et spécificités fonctionnelles

On distingue plusieurs types d'acini (Figure 5) suivant la composition de leur produit de sécrétion, leur morphologie et leur coloration à l'hématoxyline-éosine :

- **L'acinus séreux**, constitué de cellules séreuses basophiles (coloration bleue) d'aspect pyramidal, possédant un gros noyau situé au pôle basal. La portion apicale est riche en grains de zymogène. Les cellules possèdent de nombreuses mitochondries ainsi qu'un réticulum et un appareil de Golgi bien développés, où les enzymes salivaires sont synthétisées. Les cellules se disposent autour d'une lumière canalaire étroite.

- **L'acinus muqueux**, constitué de cellules muqueuses acidophiles (coloration rose pâle), ces cellules possèdent un noyau aplati situé au pôle basal et un cytoplasme gaufré contenant du mucus sous forme de grains mucigènes. Les organites intracellulaires de synthèse sont nombreux. Ces cellules se disposent toujours autour d'une lumière canalaire large.

- **L'acinus mixte**, réunit des cellules séreuses et muqueuses disposées de la façon suivante : les cellules muqueuses forment un tube dont le fond est doublé par un croissant de cellules séreuses appelé « croissant de Gianuzzi ».

Selon la forme des unités sécrétrices et leur richesse en ces éléments sécrétoires, les parotides sont qualifiées de glandes acineuses séreuses (Figure 5A), les glandes

submandibulaires de glandes tubulo-acineuses séro-muqueuses (Figure 5B) et les glandes sublinguales de glandes tubulo-acineuses muco-séreuses (Figure 5C).

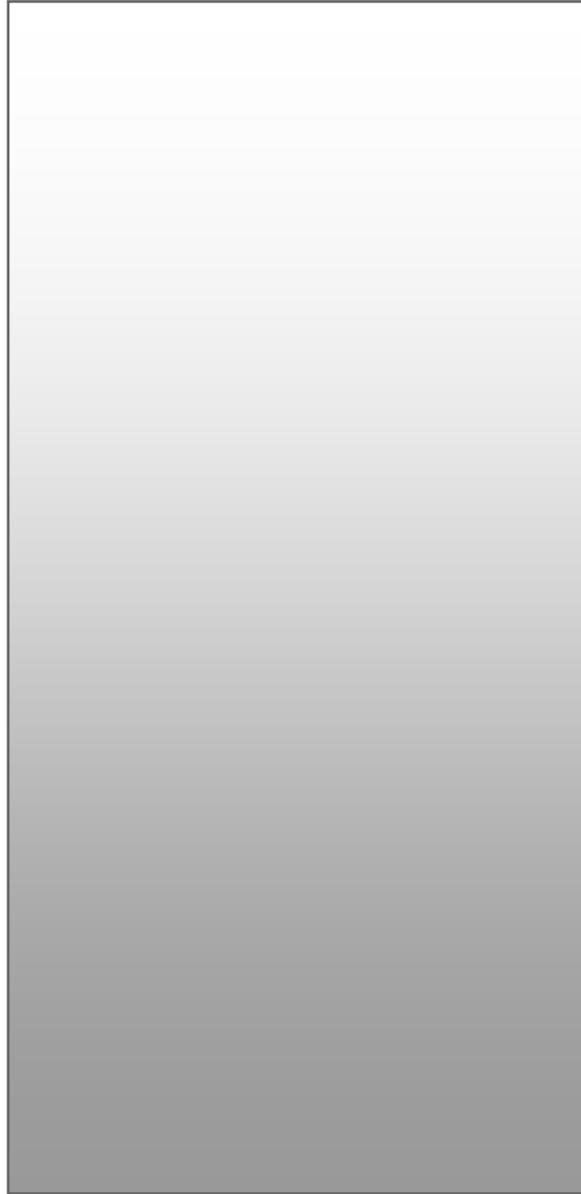


Figure 5 : Coupes histologiques de glandes salivaires majeures chez l'homme :
A. glande parotide ; B. glande submandibulaire ; C. glande sublinguale.
(<http://www.pathologyoutlines.com>)

2.4.3. Particularités structurales chez le rongeur

La glande submandibulaire chez le rat possède quelques particularités. Elle contient deux types de compartiments sécrétoires possédant deux modes de sécrétion différents : les acini et les tubules contournés granulaires (GCT, de l'anglais Granular Convolved Tubules). Les acini constituent la partie prédominante et sont de type séromuqueux. Le GCT est un type de canal sécrétoire spécialisé : il se situe entre le canal intercalaire et le canal strié et caractérise les glandes submandibulaires des rongeurs (Young et Van Lennep, 1978)

(Figure 6). Les GCTs sont peu ou pas impliqués dans la production de mucines. Par contre, ils jouent un rôle important dans la synthèse des protéines salivaires (Gresick et al., 1996 ; Tucker, 2007). La figure 7 présente les différences histologiques entre la glande SM de rat et d'homme.

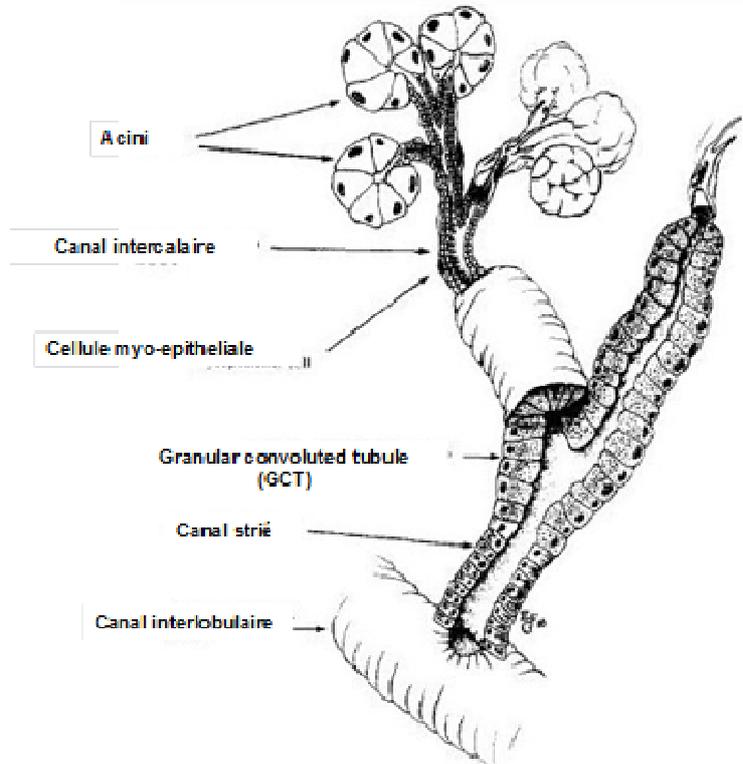


Figure 6 : Schéma d'un adénomère salivaire submandibulaire de rongeur (Lesson, 1967).

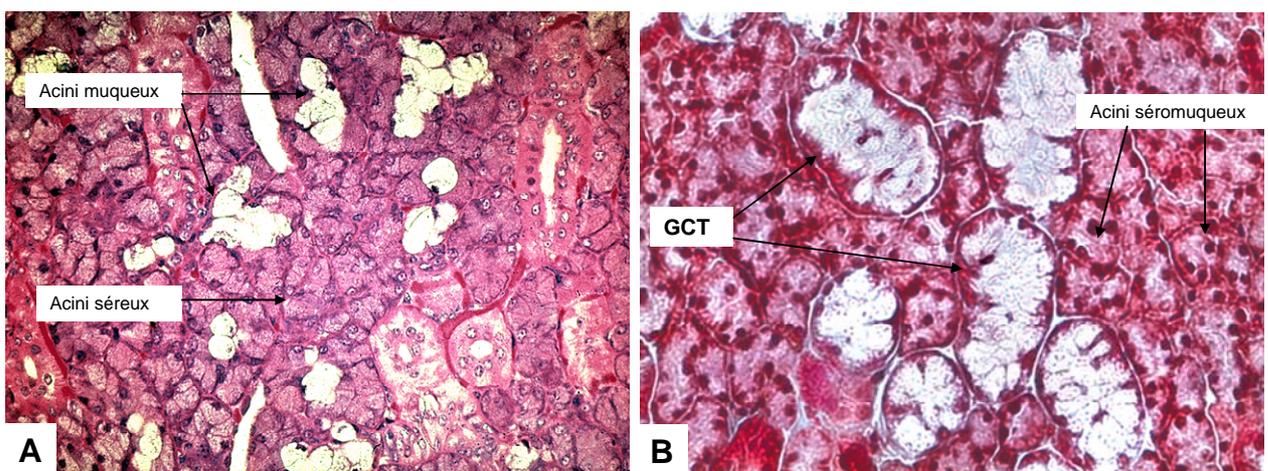


Figure 7 : Comparaison histologique entre la glande submandibulaire de l'homme (A) et la glande submandibulaire de rat (B) ; GCT : Granular convoluted tubule ou tubule granulaire contourné.

2.5. Embryogénèse et développement

2.5.1. Origine embryonnaire

L'embryogénèse des glandes salivaires chez les mammifères a été décrite par plusieurs auteurs (Borghese, 1950; Grobstein, 1953; Redman et Sreebny, 1970; Lawson, 1972, Ball 1974). D'une manière générale, la glande submandibulaire et la glande sublinguale se développent à partir d'invaginations de l'endoblaste du plancher oral tandis que la glande parotide apparaît en premier et s'individualise à partir d'une invagination en forme de sillon de l'ectoblaste, tout comme la glande mammaire (Rosai, 1996 ; Matoso et al., 2009). Ceci expliquerait d'ailleurs les similitudes en termes de morphologie, de dépendance aux hormones, de mécanismes cellulaires et d'histopathologie des tumeurs de la parotide et du sein (Actis, 2005). De plus, la formation des glandes salivaires suit le processus de morphogénèse par ramification, lequel est commun aux glandes mammaires ou à d'autres organes comme les poumons (Hogan, 1999).

2.5.2. Développement prénatal

La morphogénèse des glandes salivaires submandibulaires se déroule en quatre étapes: le stade du bourgeon initial, le stade pseudoglandulaire, le stade canaliculaire, et le stade des bourgeons terminaux (Tucker, 2007).

L'épithélium oral commence à proliférer sur le plancher de la cavité buccale en envahissant le mésenchyme sous-jacent formant un bourgeon épithélial. Le lendemain, la ramification débute par une fente profonde et le mésenchyme se condense en périphérie du bourgeon en une capsule. Un réseau de branches épithéliales organisé en « arbre » se forme, avec un bourgeon terminal au bout de chaque branche. Les grappes épithéliales à la fin de chaque tige sont appelées "bourgeons terminaux." La ramification se continue jusqu'à la fin du stade pseudoglandulaire. La majorité des canaux et les bourgeons terminaux se creusent d'une lumière au stade canaliculaire; au cours de ce stade les pro-acini se différencient (Figure 8). A ce stade embryonnaire, les cellules pro-acineuses semblent sécréter des isoformes de mucines dont le rôle reste inconnu.

Chez l'homme, ces événements ont lieu entre la 8^{ème} et la 18^{ème} semaine de gestation. Chez le rat, la période comparable de développement se situe entre le 14^{ème} et le 18^{ème} jour de gestation.

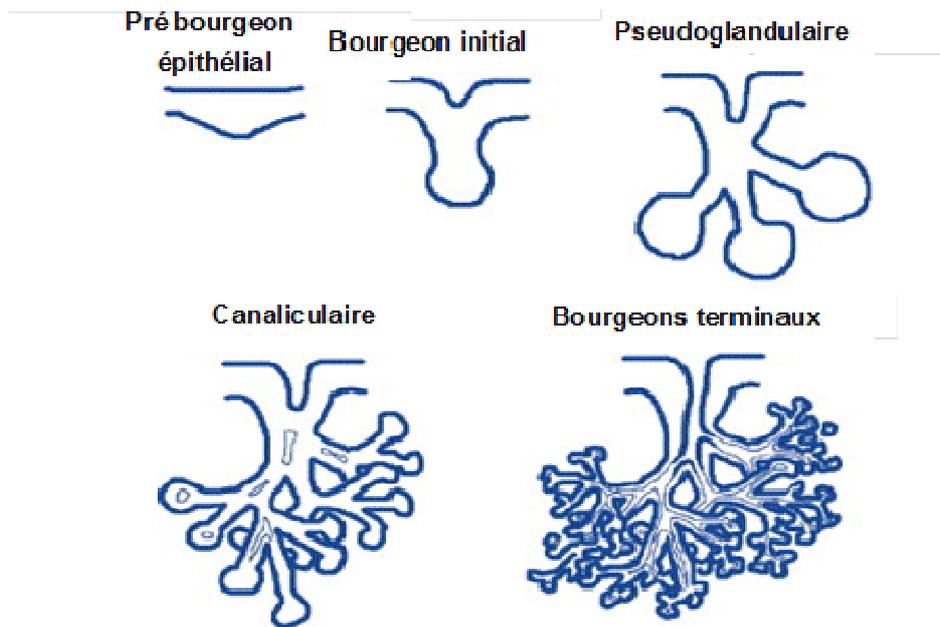


Figure 8 : Schéma représentant les stades de développement de la glande salivaire submandibulaire (Tucker, 2007).

La glande submandibulaire des rongeurs a souvent été utilisée comme un modèle pour le processus général de la morphogénèse par ramification car son mode de ramification est clairement défini, l'isolement de la glande est relativement facile, et qu'il existe un système bien établi pour la culture *ex-vivo* de la glande submandibulaire (Sakai et Onodera, 2008; Rebutini et Hoffman, 2009) (Figure 9).

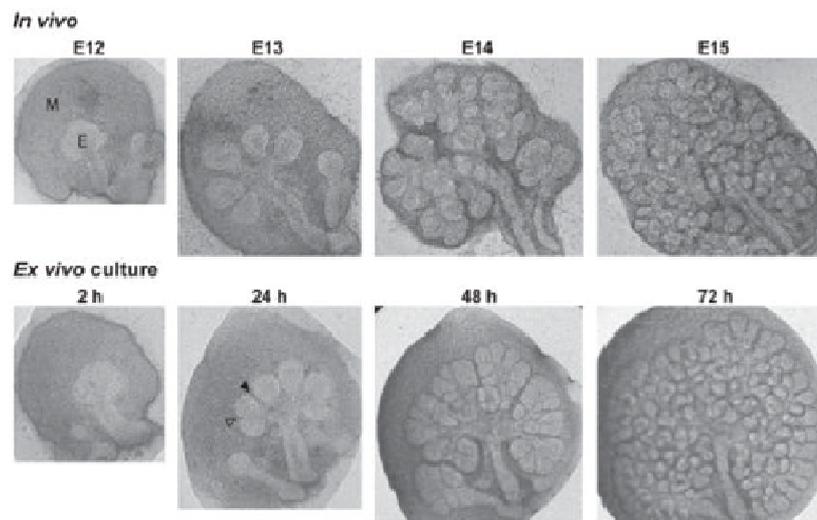


Figure 9 : Morphogénèse par ramification de la glande submandibulaire en culture in vivo et en ex vivo (chez la souris) (Rebutini et Hoffman, 2009); la SM de souris a été isolée au 12^{ème} jour embryonnaire M= mésenchyme, E= épithélium ; les flèches désignent l'approfondissement des invaginations.

2.5.3. Développement post-natal

A notre connaissance, aucune étude concernant le développement postnatal des glandes salivaires chez l'homme n'a été effectuée, étant donnée la difficulté de mettre en place une étude expérimentale chez les êtres humains en utilisant des tissus sains et en évaluant l'évolution des glandes à différents stades du développement. Chez le rat, par contre, l'évolution postnatale de la glande submandibulaire a été largement étudiée (Jacoby et Leeson, 1959 ; Srivastava, 1977 ; Hayashi, 2000).

A la naissance, la SM est composée d'unités sécrétoires transitoires appelées tubules terminaux (« terminal tubules ») et de quelques cellules pro-acineuses (acini non différenciés) qui sont les précurseurs des acini (Figure 10). Pendant le 1^{er} mois de la vie postnatale, ces cellules pro-acineuses se différencient en cellules acineuses à partir des ramifications des tubules terminaux ; les segments de ces tubules perdent leurs granules et se convertissent en système canalaire intercalaire (canaux intercalaires). En parallèle, quelques canaux striés deviennent considérablement contournés et commencent à stocker de petits granules de zymogène (secrétions enzymatiques) dans leur cytoplasme apical. Cette transformation des canaux striés en GCT est évidente à partir de la 4^{ème} semaine, (Gresik, 1980), c'est-à-dire aux environs du 30^{ème} jour (J30), soit au début de la phase pubertaire, une semaine après le sevrage.



Figure 10 : Schéma du développement postnatal de la glande submandibulaire chez les rongeurs (<http://www.m.kanazawa-u.ac.jp/eng/gaiyou/dep02/dep2-01.html>).

En résumé, le développement postnatal de la glande SM de rongeurs implique des processus cellulaires compliqués. Le premier stade de ce développement est la différenciation des acini à partir des cellules pro-acineuses, et la régression des tubules terminaux à partir desquels seront formés les canaux striés et intercalaires. Le développement complet des GCT se fait à partir de leurs précurseurs qui sont les canaux striés, ce qui constitue le stade final du développement. Les GCT sont caractérisés par un dimorphisme sexuel qui devient nettement apparent chez les rongeurs vers la 7^{ème} semaine (J50), c'est-à-dire à la fin de la puberté. (Gresik, 1975, Gresik et al 1980).

3. Fonctions sécrétrices des glandes salivaires

3.1. Fonction exocrine et production de la salive

3.1.1. Elaboration de la salive

Depuis l'antiquité la salive était connue pour son pouvoir antiseptique et était utilisée pour désinfecter les germes. Mais ce n'est que plus tard que son rôle physiologique fut reconnu (Mandel, 1993). La salive est composée de centaines de composés qui lui confèrent des rôles bien spécifiques et dont la sécrétion peut dépendre de plusieurs facteurs, dont les hormones stéroïdiennes.

La production de la salive est réalisée en deux phases (Thaysen et al., 1954). La phase primaire est effectuée au niveau des acini qui produisent la salive primaire (sécrétion de protéines, d'eau et d'électrolytes). La sécrétion active de l'ion Cl^- est à l'origine de la production de la salive. Au cours de la phase définitive, la salive passe dans la lumière des canaux striés qui réabsorbent les ions Na^+ en échange d'ions K^+ , ce qui rend la salive hypotonique. La salive définitive ainsi formée est dite « élaborée ». Elle est déversée dans le canal inter-lobulaire pour rejoindre la bouche (Figure 9). La salive totale résulte de ces deux phases et est un mélange des produits de sécrétion des glandes majeures et des glandes mineures.

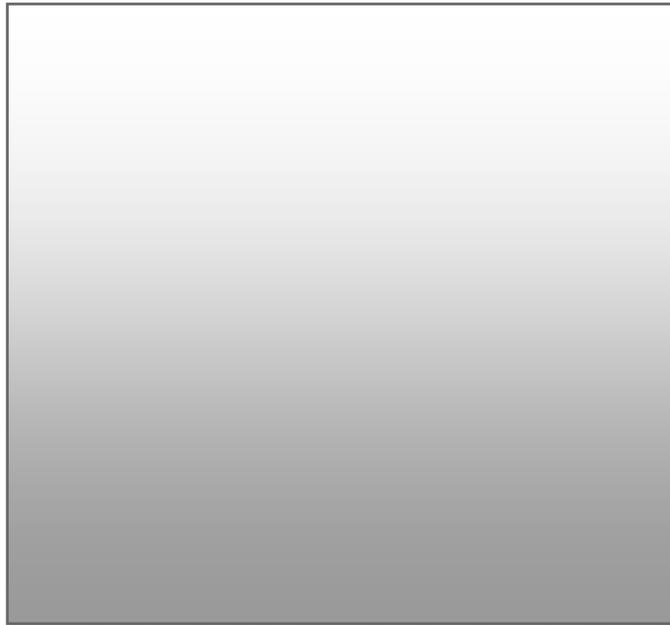


Figure 11 : Schéma représentant la production de la salive
<http://coproweb.free.fr/pagphy/physioan/ch5s1.htm>

Les glandes salivaires produisent une grande quantité de salive (jusqu'à 750mL/jour chez l'homme) et les sécrétions au cours d'une journée de 24H peuvent atteindre 3L/j. Son pH varie de 6,7 à 7,4. Cependant le débit salivaire varie selon le type de stimulation, le rythme circadien et l'état du sujet (Tableau I, Vidailhet et al., 2000).

Tableau I : Variation des pourcentages de sécrétion salivaire des glandes majeures au cours de différentes situations chez l'homme (Vidailhet et al., 2000)

	Sécrétion non stimulée (de repos)	Sécrétion stimulée acide (gustation)	Sécrétion stimulée mécanique (mastication)	Sécrétion au cours du sommeil
Glandes submandibulaires (mixtes à dominance séreuse)	70%	60%	30%	45 à 80%
Glandes parotides (séreuses)	20%	31%	60%	0%
Glandes sublinguales (mixtes à dominance muqueuse)	5%	3%	5%	10%

La salive est constituée principalement d'eau (99%), d'électrolytes (éléments minéraux) et de composés organiques parmi lesquels des glycoprotéines et plus de 700 protéines, dont environ 30% seraient apportées par la circulation sanguine (Schulz et al., 2012). Les

constituants de la salive ne sont donc pas tous issus des sécrétions salivaires, et on distingue des produits intrinsèques, c'est-à-dire propres aux glandes salivaires, et les produits extrinsèques, qui proviennent soit de la cavité buccale, soit d'organes périphériques comme le pancréas, le tube digestif ou d'autres glandes du système endocrinien et qui sont apportés par la circulation sanguine ou par la cavité buccale.

3.1.2. Produits de la salive intrinsèques aux glandes salivaires

3.1.2.1. Les électrolytes (éléments minéraux)

Les éléments minéraux constituent la partie inorganique de la salive et participent au maintien du pH salivaire. On y retrouve des ions potassium, sodium, calcium, hydrogène, chlorure, phosphate, bicarbonate. Des thiocyanates, des halogènes (l'iode, le fluor) et des métaux (le cuivre et le fer) sont présents à l'état de traces.

Les électrolytes sont relativement indépendants des concentrations plasmatiques car ils sont le reflet d'un système de transport actif. Le sodium et le chlore sont directement reliés aux flux salivaire, et le calcium en dépend uniquement lorsque le flux est élevé. La concentration acineuse de Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- est proche de celle du plasma, mais les canaux extraient du Na^+ et du Cl^- et ajoutent du K^+ et du HCO_3^- . Ce mécanisme est responsable de l'hypotonicité, de l'alcalinité et de la concentration élevée de la salive en potassium lorsque le flux est lent. Au contraire, lorsque le flux est rapide, la composition salivaire est plus proche de celle du plasma car elle a moins de temps pour être modifiée dans le système canalaire (Tableau II, Mandel, 1980).

Globalement, la composition ionique de la salive chez le rat ressemble à celle de l'homme sauf pour le calcium et le magnésium qui ont des concentrations beaucoup plus élevées chez le rat et atteignent, dans la salive après stimulation, respectivement 14 mmol/L et 9 mmol/L. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les humains et les rongeurs sont soumis à des régimes alimentaires différents (Ericsson, 1962).

Tableau II : Composition ionique de la salive humaine (Mandel, 1980)

Les concentrations sont en mmol/L, sauf où indiquer

	Salive totale (Fluide buccal)	
	Non stimulée	Stimulée
Na ⁺	8	32
K ⁺	21	22
Ca ⁺⁺	1,35	1,7
Mg ⁺⁺	0,3	0,4
Cl ⁻	24	25
HCO ₃ ⁻	2,9	20
HPO ₄ ⁻	5,5	10
I ⁻ (μmol/l)	0	14
F ⁻ (μmol/l)	1,5	5

3.1.2.2. Les glycoprotéines

- **Les mucines** : Les mucines salivaires sont des glycoprotéines qui sont secrétées essentiellement par les cellules muqueuses des glandes submandibulaire et sublinguale de l'homme et du rat (Cohen et al., 1990; Audie et al., 1993; Nielsen et al., 1996 ; Nashida et al., 2010). Ces glycoprotéines polymérisent en milieux aqueux et retiennent de grandes quantités d'eau, pour former un gel visqueux recouvrant les tissus de la cavité buccale, permettant ainsi de lubrifier les aliments. Ces mucines participent également à l'élaboration de la pellicule exogène formée par agrégation des bactéries, des cellules buccales desquamées et des tanins alimentaires et qui se fixent aux surfaces dentaires (Al-Hashimi et Levine, 1989).

- **Les agglutinines** : Les agglutinines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire (340kDa) fabriquées par différents organes dont le poumon. Leur structure est très proche de celle des mucines. Dans les glandes salivaires, elles sont synthétisées par tous les types de glandes salivaires. Cependant, dans les parotides, elles sont localisées seulement dans les cellules ductales, alors que dans les submandibulaires et les sublinguales, on en trouve aussi dans les acini. Elles ont un rôle antimicrobien et

interviennent dans l'agrégation immunitaire de microorganismes (Amerongen et Veerman, 2002).

- **Le lysozyme** : Le lysozyme est aussi un facteur de défense non spécifique bien connu pour son pouvoir antibactérien. C'est une glycoprotéine qui a la capacité de détruire les parois cellulaires des bactéries, en coupant le lien glycosidique β (1,4). On le retrouve au niveau des cellules séreuses des glandes parotides et submandibulaires de mammifères (Schackelford et Klapper, 1962).

- **Les glycoprotéines marqueurs du groupe sanguin** : Les glycoprotéines marqueurs du groupe sanguin ont pour rôle essentiel d'interférer dans le développement et la prévention des maladies infectieuses par voie orale (Greenwell, 1997). Elles sont synthétisées dans les acini séreux et muqueux et dans les cellules ductales (Cossu et Lantini, 1996).

3.1.2.3. Les protéines enzymatiques

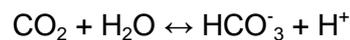
Les glandes salivaires produisent une grande diversité de protéines enzymatiques parmi lesquelles des amylases, des lipases, des arginases, des acétylcholinestérases, des anhydrases carboniques, des peroxydases... et d'autres protéines plus complexes comme les protéines riches en proline (PRP) ou les cystatines (Nashida et al., 2010). Ne sont présentées dans ce mémoire que les protéines les plus représentatives et les plus documentées.

- **L' α -amylase** : L' α -amylase salivaire, qui est synthétisée par les cellules séreuses et stockée dans les grains de zymogène, représente à peu près 20% de l'ensemble de la production des glandes salivaires en protéines, et constitue l'enzyme principale de la salive. Cependant, une partie des amylases salivaires provient d'autres organes (pancréas, tube digestif, foie..). Au niveau des glandes salivaires, elle est produite par les acini séreux de la glande parotide et de la glande submandibulaire de tous les mammifères. Il s'agit d'un métalloenzyme contenant du chlore et du calcium qui hydrolyse les liaisons α (1, 4) de l'amidon en glucose et en maltose (Zakowski et Bruns, 1985). Elle a un rôle dans l'initiation de la digestion et également un rôle dans la protection des dents et dans la modulation de l'adhésion des bactéries au niveau de la surface orale (Scannapieco et al., 1993). Elle joue aussi un rôle dans la perception gustative en favorisant la libération des sucres simples, les rendant disponibles pour les récepteurs gustatifs. Ferry et al (2006) ont montré qu'elle pouvait aussi réduire le goût salé des aliments. L' α -amylase est sécrétée suite à la stimulation du système nerveux autonome et l'augmentation marquée de sa concentration a été considérée comme une indication de l'activation autonome. Par exemple, il y a des

évidences quant à l'augmentation d' α -amylase en réponse aux facteurs de stress, comme l'exercice du tapis roulant (Gilman et al., 1979a), l'exposition à une chambre à haute pression (Gilman et al., 1979b), l'exercice à vélo (Chatterton et al., 1996; Walsh et al., 1999) ou encore une exposition au froid (Chatterton et al., 1996). L'augmentation de la concentration en α -amylase salivaire a été montrée aussi dans le cas d'une réponse à un stress psychologique (Bosch et al., 1996, 1998; Skosnik et al., 2000 ; Rohleder et al., 2004).

- **Le système peroxydase** : C'est l'un des composés les plus importants du système antioxydant de la salive, très impliqué dans son rôle antibactérien. Les peroxydases avec les myéloperoxydases sont secrétées par les glandes salivaires majeures de l'homme et du rat (Yamashina et Barka, 1974 ; Nagler et al., 2002 ; Nashida et al., 2010). Le système peroxydase décompose le H_2O_2 produit par les bactéries, en ions hypothiocyanite ($OSCN^-$) qui sont capables d'éliminer les bactéries de la cavité buccale, en inactivant les enzymes glycolytiques bactériennes (Aune et Thomas ,1977 ; Grisham et Ryan, 1990).

- **L'anhydrase carbonique VI ou Gustine (CA VI)** : L'anhydrase carbonique (CA VI) est une enzyme salivaire très importante qui catalyse la réaction réversible suivante :



Elle est aussi impliquée dans la balance ionique acido-basique dans d'autres tissus (Sly et Hu 1995). Jusqu'à maintenant 11 isoenzymes à activité anhydrase carbonique ont été recensées. La CA VI est la seule isoenzyme sécrétoire ; elle a été caractérisée pour la première fois au niveau de la glande parotide d'ovins (Fernley et al., 1979). En 1998 Thatcher et al ont pu confirmer par séquençage de protéines que la CA VI était en fait la gustine, une protéine salivaire impliquée dans la fonction gustative. La CA VI a été purifiée de la salive humaine et de rat : c'est une métalloprotéine à Zinc de 42kDa. Elle est secrétée par les cellules séreuses des glandes submandibulaires et parotides, chez l'homme et chez le rat (Hennigar et al., 1983 ; Murakami et Sly 1987; Parkkila et al., 1990). La CA VI salivaire est impliquée dans la protection des dents contre les caries (Kivela et al., 1999), dans la neutralisation des acides au niveau de l'œsophage et de l'épithélium gastrique. Elle joue aussi un rôle primordial dans la croissance des bourgeons gustatifs et dans la perception du goût (Shatzman et Henkin, 1981 ; Henkin et al., 1999a ; Henkin et al., 1999b).

- **Les cystatines** : Les cystatines sont des protéines riches en cystéines. Elles sont surtout synthétisées au niveau des acini séreux et des canaux striés des glandes sublinguales et submandibulaires. Une dizaine d'isoformes sont retrouvées dans la salive, dont la cystatine SN, la cystatine S et la cystatine C, qui sont associées aux perceptions gustatives. Ce sont des inhibiteurs de protéases, et elles joueraient un rôle dans la régulation de l'activité protéolytique de la salive lors des processus inflammatoires et/ou

infectieux. Chez les rongeurs, elles sont normalement peu exprimées dans la salive comparativement à l'homme, mais elles sont fortement inductibles par certains médicaments, ou par des aliments riches en tannins. Elles sont produites au niveau des acini séreux et des canaux striés (Amerongen et Veerman, 2002). Elles sont le plus souvent indifféremment exprimées par les trois types de glandes. Chez le rat, une analyse en PCR montre que l'expression des Cystatine B et C est majeure, mais identifie la Cystatine 10 comme très spécifique de la parotide (Nashira et al 2010).

- **Les protéines riches en proline (PRPs)** : Les PRPs ont été détectées en premier lieu dans la salive de l'homme (Mandel et al., 1965). Elles ont été aussi retrouvées dans la salive des rongeurs (Mehansho et al., 1983; Mehansho et Carlson, 1983; Mole et al., 1990). Chez ces mammifères, les PRPs constituent le groupe de protéines le plus répandu dans la salive. Elles sont caractérisées par une prédominance de l'acide aminé « proline » : chez le rat et l'homme, elles sont constituées à 40% de proline (Mehansho et al., 1985; Mole et al., 1990). Elles sont abondamment produites par les acini séreux de la parotide et de la sous-maxillaire où on distingue plusieurs isoformes. Les PRPs acides sont produites en quantité égale par l'une ou l'autre des glandes, tandis que les Glyco-PRP (GPRP) et les PRP acides sont en premier lieu produites par la parotide (Walz et al., 2006). Les PRPs basiques ont essentiellement pour rôle de réduire les effets nocifs des tanins alimentaires, et les PRPs acides agissent principalement dans le maintien de l'homéostasie du calcium dans la cavité buccale (Bacon et Rhodes, 2000; Chan et Bennick, 2001).

- **Les immunoglobulines sécrétoires** : La salive est riche en immunoglobulines, mais seules les immunoglobulines de type IgA sont synthétisées au niveau des glandes salivaires. Ce sont les plus représentées et leur concentration salivaire est largement supérieure à leur concentration sérique. Elles sont produites par toutes les glandes salivaires, en réponse à un stress ou à une infection buccale (Bosch et al., 2003). Les IgA sécrétoires se trouvent souvent en contact avec les éléments externes de l'environnement qui pénètrent par voie orale. Par conséquent ces dernières jouent un rôle important dans la défense contre les bactéries et les virus qui s'introduisent dans l'organisme (Renegar et al., 2001).

- **Les lipocalines** : ce sont des petits peptides d'une vingtaine de kDa qui ont un rôle de transport de molécules lipophiles et qui interviennent dans divers processus biologiques dont la réponse immunitaire, le cancer, et des processus allergiques. On en retrouve dans tous les fluides biologiques, dont les larmes et la salive. Les lipocalines sécrétées par les glandes salivaires, en particulier par les glandes mineures, interviennent dans le transport des phéromones et dans le transport de molécules odorantes ou sapides, en particulier les

molécules lipidiques ou lipophiles ; elles sont sécrétées avec le lysozyme (Glasgow, 1995), et agiraient directement au niveau des papilles gustatives (Li et Snyder, 1995).

- **Autres composants** On peut retrouver aussi au sein de la salive de la lactoferrine, des estérases, des transaminases, des collagénases, des gélatinases, des cholinestérases et des ribonucléases. Elles jouent principalement un rôle antimicrobien. Parmi elles, les histatines sont produites par les acini séro-muqueux tandis que la lactoferrine est produite par les canaux dans les trois types de glandes (Amerongen et Veerman, 2002). La salive contient aussi des substances issues des sécrétions endocrines des glandes salivaires dont certaines kallikréines, mais aussi des facteurs de croissance dont les plus importants sont le nerve growth factor (NGF) et l'epithelial growth factor (EGF). De plus, la glande submandibulaire peut synthétiser des androgènes, de l'insuline et des hormones thyroïdiennes (Deville De Pierre et Arancibia, 1988).

3.1.3. Produits de la salive extrinsèques aux sécrétions salivaires

3.1.3.1. Protéines exogènes et/ou résiduelles

Parmi les composés extrinsèques de la salive, on retrouve certaines isoformes de protéines produites par les glandes salivaires (amylase, immunoglobuline etc...), mais aussi d'autres composés qui sont véhiculés par la circulation sanguine depuis les organes périphériques. C'est le cas en particulier des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, dont les taux salivaires sont proches des taux sériques, ou encore de certains facteurs de croissances comme le TGF ou l'IGF, en provenance du pancréas.

3.1.3.2. Résidus chimiques d'origine alimentaire

Ils passent dans la circulation sanguine au cours du processus digestifs. On y compte des produits naturels qui passent dans la circulation, qui peuvent être des micro-constituants végétaux ou des contaminants alimentaires, tels que des résidus de pesticides à l'état libre, jamais sous forme conjuguée (Caporossi et al., 2010 ; Mullangi et al., 2009). De fait, on y retrouve également des perturbateurs endocriniens comme le bisphénol A, un composé œstrogénique issu d'emballages alimentaires (Yang et al., 2011) ou le chlorpyrifos, un insecticide organophosphoré doté de propriétés anti-androgéniques (Timchalk et al., 2007 ; Viswanath et al., 2010).

3.1.3.3. Déchets buccaux

Il s'agit principalement de déchets organiques et de résidus protéiques issus de la desquamation de l'épithélium buccal, de la flore microbienne buccale ou de résidus alimentaires. Lors de soins dentaires, on y trouve aussi des composés comme le bisphénol A, qui migre des résines utilisées comme pansements dentaires. Des constituants tels que l'urée, l'acide urique et le cholestérol sont également présents dans la salive (Deville De Pierre, 1988).

3.1.3.4. Agents pathogènes

La salive est vecteur de pathogènes chez de nombreux insectes (tiques, moustiques....) mais aussi chez les mammifères, en particulier les virus comme celui de l'hépatite B, le VIH ou encore le virus de la rage.

3.1.4. Rôles de la salive

Grâce à sa composition bien spécifique, la salive permet de maintenir l'homéostasie buccale et tout changement qui affecte sa fonction peut compromettre l'intégrité de toute la cavité buccale et des fonctions gastro-intestinales. Nous avons présenté quelques-uns de ces rôles au fur et à mesure de la présentation de sa composition. Nous exposons ici les données de la littérature qui ont conduit à préciser les rôles plus spécifiques de la salive. Les différents rôles de la salive sont repris dans le diagramme de la figure 12, élaborée par Amerongen et Veerman (2002).

D'une manière globale, les fonctions salivaires visent à contrôler trois points précis :

- la prise en bouche de l'aliment pour favoriser les premières étapes de la digestion et favoriser les perceptions gustatives,
- le contrôle de la flore buccale et la protection contre des microorganismes pathogènes, qui peuvent altérer ou modifier les perceptions gustatives, mais également occasionner des processus inflammatoires (ex : gengivites),
- la protection des dents en contrôlant l'acidification de la salive et tout autre processus pouvant déminéralisation des dents et favoriser l'apparition de caries.

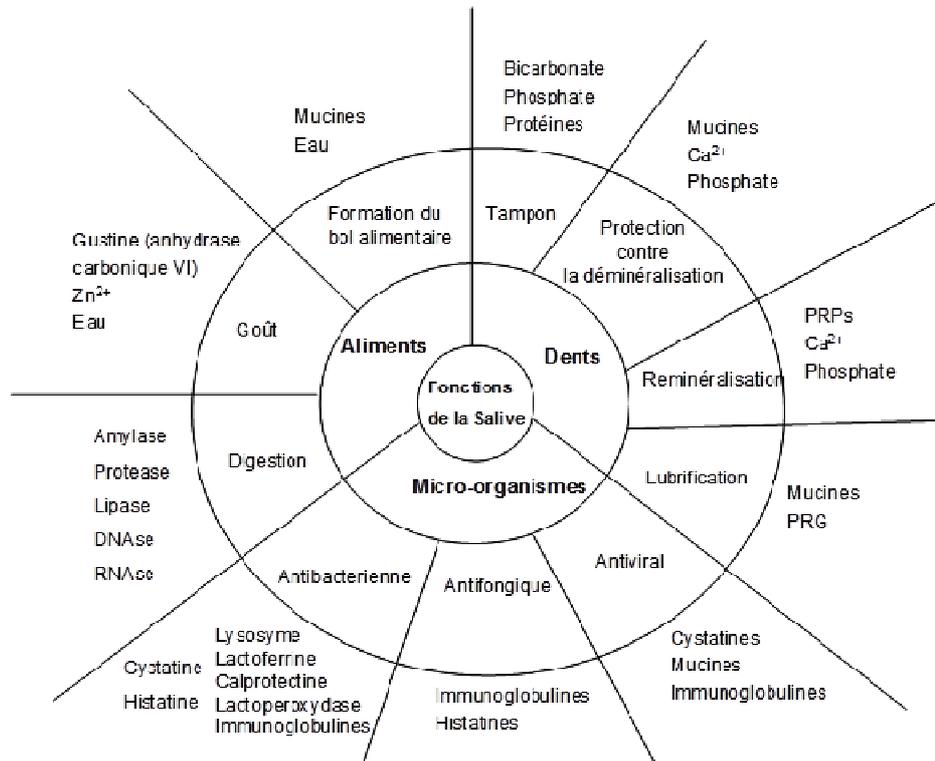


Figure 12 : Les principaux rôles de la salive (Amerongen et Veerman, 2002).

3.1.4.1. Maintien de l'homéostasie buccale

- *Activité antimicrobienne*

Les glandes salivaires secrètent diverses substances à propriétés antibactériennes (décrites précédemment) qui se trouvent impliquées dans la protection des dents et des muqueuses, et ont donc un rôle dans la protection et le maintien de l'intégrité buccale (Devoize et Dallel, 2010).

Parmi ces substances on trouve les IgA, le lysozyme, la peroxydase et la lactoferrine. Ces peptides antimicrobiens contenus dans la salive pourraient d'ailleurs être utilisés dans le traitement de maladies parodontales, touchant les tissus de soutien des dents (Gorr et Abdolhosseini, 2011). Une étude groupant des sujets humains (Edgar, 1994) a montré le rôle de la salive dans la protection des dents contre les caries. Cette protection contre les caries résulterait du pouvoir que possède la salive dans l'inhibition de la déminéralisation de l'émail et dans la re-minéralisation des nouvelles dents. L'EGF salivaire joue aussi un rôle important dans la cicatrisation et la protection des tissus muqueux des cavités buccale et gastrique (Sarosiek et al., 1988).

- *Pouvoir tampon*

Le pH de la salive varie au cours d'une journée. Lors du stimulus masticatoire, le pH moyen de la salive passe de 6 à 7,2, tandis qu'il diminue pendant le sommeil. Toutefois, à

partir d'un pH de 5,5, des processus de déminéralisation peuvent se mettre en place et entraîner des caries dentaires ou des pathologies buccales. Le pouvoir tampon de la salive a été étudié pour la première fois en 1946 par Dreizen et al. Ce pouvoir dépend de la concentration en bicarbonates qui permettent la neutralisation des acides et permettent aussi la synthèse d'ammoniac (Bardow et al., 2000), ces bicarbonates étant d'origine plasmatique, ou libérés par les canaux striés des glandes salivaires. Il est aussi corrélé au débit salivaire (Wikner et Söder 1994). De plus, il est étroitement relié à l'activité de la gustine (anhydrase carbonique VI) produite dans les acini (Frasseto et al., 2012 ; Kivelä et al., 1997). L'âge, le sexe, le tabagisme et l'alcoolisme peuvent influencer ce pouvoir tampon (Enberg et al., 2001 ; Heintze et al., 1983 ; Percival et al., 1994 ; Scott et al., 1988).

- Homéostasie hydrique

L'élément majeur de la salive est l'eau (97 à 99%). Le flux des glandes salivaires et particulièrement de la glande parotide permet une bonne hydratation du corps (Ship et Fischer, 1997).

La soif est déclenchée par la sensation de sécheresse buccale, provenant d'une diminution de la sécrétion salivaire de repos, entraînant la stimulation de récepteurs sensitifs intra-buccaux. Les changements osmotiques plasmatiques sont aussi détectés par l'hypothalamus (osmo-récepteurs) libérant l'hormone antidiurétique (qui diminuera l'excrétion d'eau au niveau rénal), et par l'appareil juxta-glomérulaire rénal entraînant, grâce au système rénine-angiotensine, la libération d'aldostérone par les glandes corticosurrénales, diminuant, en conséquence, l'excrétion de sels.

La sensation de satiété qui déclenche l'arrêt de l'absorption de liquides, dépend de la stimulation des récepteurs gustatifs. Il est souvent difficile de différencier les sensations de sécheresse buccale d'origine centrale (anomalies de fonctionnement des mécanismes de régulation de la prise hydrique) de celles associées à des dysfonctionnements des glandes salivaires.

3.1.4.2. Solubilisation du bol alimentaire

Chez les mammifères, la salive joue également un rôle de lubrification du bol alimentaire. Durant la mastication, les aliments se mélangent à la salive pour former le bol. L'eau de la salive humidifie les particules de nourriture, tandis que les mucines salivaires lient les aliments mastiqués et les transforment en un bol lisse qui pourra être facilement ingurgité et passera dans l'œsophage sans en endommager la muqueuse (Pedersen et al., 2002). Tabak (1995) pense que le rôle de la salive dans la formation du bol alimentaire, la déglutition et même dans la phonation est assuré essentiellement grâce aux mucines qui ont

une faible solubilité, une grande viscosité et une élasticité, ce qui facilite tout contact à l'intérieur de la cavité buccale.

La pré-digestion, quant à elle, est assurée par les enzymes telles que l' α -amylase salivaire et la lipase qui participent aux premières étapes de la digestion des sucres et des graisses (Valdez et Fox, 1991).

3.1.4.3. Perceptions gustatives et autres perceptions sensorielles

Il a été établi chez l'homme qu'il existe une interaction directe entre la salive et la perception gustative (Spielman, 1998). En effet, la salive peut agir sur le stimulus et changer le goût ; inversement, le stimulus peut modifier la composition salivaire. La salive solubilise les molécules et les délivre aux récepteurs gustatifs spécifiques situés au niveau des bourgeons du goût. Il a été proposé que les composants de la salive jouent un rôle primordial dans le maintien et la protection des bourgeons gustatifs (Matsuo, 2000). Les patients souffrant de dysfonctionnement des glandes salivaires (xérostomie) et ceux ayant subi une radiothérapie de la tête et du cou présentent en effet un nombre de papilles réduit et une altération des bourgeons gustatifs consécutive à une altération des glandes salivaires, y compris des glandes salivaires mineures (Spielman et al., 2004). Une étude chez les rats montre qu'une ablation des glandes salivaires diminue le nombre des papilles gustatives au niveau de la langue et désorganise les bourgeons du goût (Nanda et Catalanotto, 1981). Ces études confirment le rôle important de la salive dans la fonction gustative. La salive est donc primordiale pour la perception du goût des aliments. D'ailleurs la ligature des canaux salivaires ou l'ablation des glandes salivaires majeures chez le rat provoquent une diminution de la perception gustative et l'apparition de troubles au niveau de la préférence alimentaire (Galili et al., 1981).

Les enzymes digestives salivaires interviennent particulièrement dans le processus gustatif puisqu'elles peuvent interagir avec la matrice alimentaire et changer son goût. Une étude chez des sujets humains montre ainsi que l' α -amylase salivaire peut affecter des perceptions gustatives en décomposant l'amidon, entraînant ainsi la libération de saveurs spécifiques (De Wijk et al., 2004). Chez le rat, la lipase salivaire décompose les triglycérides en acides gras qui stimulent les récepteurs gustatifs (Kawai et Fushiki, 2003).

3.2. Fonction endocrine des glandes salivaires : les peptides « biologiquement actifs »

Les glandes salivaires sont considérées comme des glandes exocrines qui secrètent la salive dans un canal pour être déversée dans la bouche. Cependant, des enquêtes datant de 60 ans ont suggéré, de façon étonnante, que les glandes salivaires sont capables de sécrétions endocriniennes, et de distribuer leurs sécrétions internes directement dans le flux sanguin (Isenman et al., 1999). Cette sécrétion endocrine a été surtout décrite pour la glande submandibulaire.

Les glandes submandibulaires de rongeurs contiennent et secrètent un nombre important de protéines et de peptides physiologiquement actifs comme les enzymes digestives, les facteurs de croissance, les protéases homéostatiques, les protéines de régulation et les peptides-hormones, les kallicréines (Mori et al., 1992). Ces molécules interviennent dans plusieurs processus biologiques essentiels dans le maintien de la santé et dans le fonctionnement de la cavité buccale et du tractus digestif (Braka, 1980 ; Dolce et al., 1994 ; Tepperman et al., 1993). Elles participent aussi au maintien de l'homéostasie immunologique et physiologique (Mathison et al., 1994 ; Rougeot et al., 2000).

De plus, plusieurs études ont établi que la concentration sérique de ces substances biologiquement actives est directement liée à la production de la glande SM. Il en a été conclu que la glande SM possède une fonction endocrine et participe à plusieurs processus physiologiques comme la fonction reproductive, les réponses neuro-immunes, et la régulation du glucose (Boyer et al., 1991 ; Mathison, 1995 ; Ogata, 1955 ; Sabbadini et Berczi , 1995). C'est pour cette raison qu'au cours de cette partie nous nous focaliserons sur la glande SM puisque dans la littérature c'est elle qui est décrite comme ayant une fonction endocrine. Cette fonction endocrine consiste en la libération dans la circulation sanguine de substances biologiquement actives qui vont agir sur d'autres organes cibles. Parmi ces polypeptides on distingue les facteurs de croissance, la leptine, le NPY et les kallicréines.

3.2.1. Les facteurs de croissance

3.2.1.1. L'Epidermal Growth Factor (EGF)

L'EGF est un puissant mitogène. Il a été extrait la première fois de SM de souris en 1962 par Cohen (Cohen et Eliot, 1989). Chez les rongeurs, l'EGF est bio-synthétisé sous forme d'un précurseur au niveau des tubules granulaires (GCT) avec une taille de 160 kDa et se transforme en peptide actif de 6 kDa dans la salive. La salive représente la source majeure de l'EGF du tractus gastro-intestinal (Sarosiek et al., 1988) et il est impliqué dans la protection et le maintien de la surface des muqueuses et des bourgeons gustatifs de la

langue (Furukawa et al., 1999 ; Morris-Wiman et al., 2000). Les actions de l'EGF provenant de la glande SM peuvent aller au-delà de la cavité buccale et gastro-intestinale, et atteindre, par la circulation sanguine, des organes distants où il peut interagir avec le récepteur de l'EGF. Une des preuves de cette fonction endocrine de l'EGF submandibulaire est que l'ablation des glandes SM réduit l'EGF circulant dans le sang à des quantités négligeables (Tsutsumi et al., 1986). Plusieurs études supportent la possibilité de ce rôle endocrine de l'EGF provenant de la glande SM. Ainsi, l'EGF de la SM intervient dans la régénération du foie après une hépatectomie chez le rat (Jones et al., 1995 ; Noguchi et al., 1991). Il augmente aussi le remodelage osseux chez le rat (Dolce et al., 1994), stimule la phase méiotique de la spermatogenèse chez les souris (Tsutsumi et al., 1986), maintient la croissance utérine, la fertilité et le développement de la glande mammaire chez les femelles (Okamoto et Oka, 1984 ; Tsutsumi et al., 1993).

3.2.1.2. Le Nerve Growth Factor (NGF)

Le NGF est un polypeptide membre de la famille des neurotrophines qui favorise la croissance et la survie des neurones au cours du développement et qui maintient l'intégrité des neurones adultes. Les actions du NGF s'étendent aussi à d'autres types de cellules non-neuronales. Il est maintenant connu pour être impliqué dans l'interaction entre le système nerveux et les systèmes endocrinien et immunitaire (Manni et al., 2010). Une étude montre qu'il est aussi impliqué dans la perception gustative (Suzuki et al., 2007).

Tout comme l'EGF, le NGF est sécrété au niveau des tubules granulaires (GCT) des glandes submandibulaires de rongeurs (Gresik, 1980).

Le NGF provenant de la SM peut être libéré dans la circulation sanguine, particulièrement dans des conditions de stress. Des études physiologiques confirment cette hypothèse.

Ainsi, l'ablation de la glande SM modifie la réponse agoniste de la souris mâle, au cours de tests de rencontres sociales répétées (Bigi et al., 1994). Le comportement agressif chez des souris mâles induit par l'isolement social, provoque une libération d'une grande quantité de NGF dans la circulation sanguine provenant de la glande SM (Aloe, 1986). Les glandes surrénales sont une cible pour le NGF libéré par la glande SM suite à des combats entre souris (Bigi, 1992). De ce fait, la libération du NGF salivaire suite à des comportements agressifs pourrait participer au contrôle du comportement social (Alleva et al., 1993).

3.2.1.3. Les Transforming Growth Factors (TGF α et β)

Le TGF α est un polypeptide de 50 acides aminés, qui a la même structure et la même activité biologique que l'EGF. Il se fixe sur le même récepteur, l'EGF-R (Massagué, 1983). Il

est exprimé dans plusieurs tissus normaux (Lee et al., 1985) et il est surexprimé dans plusieurs tumeurs (Todaro et al., 1980).

L'expression du TGF α dans la glande SM a été mise en évidence la première fois en 1992 au niveau de tout son système canalaire (Wu HH et al., 1993). Mogi et al en 1995, ont démontré avec une technique ELISA que le TGF α est sécrété par les glandes SM aussi bien de rat que d'homme (Mogi et al., 1995a). Une autre étude de Mogi et al (1995b) met en évidence l'évolution postnatale du TGF α et de l'EGF et montre que la concentration du TGF α est très importante à la naissance et diminue progressivement avec l'âge, ce qui lui confère un rôle important dans la morphogenèse de la glande. L'activité endocrine du TGF α reste encore inexplorée mais Kurachi et al (1991) ont démontré que l'ablation de la glande SM réduit de moitié la concentration du TGF α dans le sérum de souris normales, ce qui confirme qu'une grande partie de ce facteur provenant de la glande SM passe dans la circulation sanguine.

La glande submandibulaire produit aussi le TGF β au niveau des GCTs (Amano et al., 1991). Il est décrit comme ayant un rôle actif dans la croissance et la différenciation cellulaire et interviendrait donc au cours de l'embryogénèse (Lehnert et Akhurst, 1988). Son rôle endocrine n'est pas bien décrit dans la littérature.

3.2.1.4. L'insuline-like Growth Factor I (IGF-1)

L'IGF est une hormone de la famille des protéines mitogènes qui contrôlent la croissance, la différenciation et le maintien de plusieurs types de cellules différenciées. Il a une structure chimique semblable à celle de l'insuline. L'IGF a été décrit longtemps comme sécrété majoritairement par le foie (grâce à la stimulation de ce dernier par l'hormone de croissance GH). Il serait ensuite libéré dans la circulation sanguine pour atteindre les tissus cibles. Mais plus tard il a été démontré que l'IGF-I est synthétisé par plusieurs tissus fœtaux et adultes (Han et al., 1987 ; Lund et al., 1986).

L'expression de l'IGF-I a été mise en évidence au niveau de la glande submandibulaire de rat et de souris (Kerr et al., 1995). Chez les rongeurs adultes, l'IGF-I a été localisé dans tous les canaux (striés, intercalaires, GCT et canaux inter-lobulaires) de la glande SM (Hansson et al., 1988). Aucune étude n'a décrit le rôle endocrine de ce facteur au niveau de la glande mais par contre plusieurs études suggèrent son rôle paracrine dans le maintien de la structure et de la fonction de la glande SM (Retsu Mitsu et al., 2010).

3.2.1.5. Autres

La glande submandibulaire des rongeurs produit aussi, et spécialement au niveau du système ductal, d'autres facteurs de croissance comme l'Hépatocyte Growth Factor (HGF)

(Amano et al., 1994), et le Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Okamoto et al., 1996). Le rôle endocrine de ces facteurs de croissance reste encore inexploité mais il semblerait qu'ils interviennent dans la protection et la cicatrisation des muqueuses.

3.2.2. Les kallibréines (KLK)

Les kallibréines forment un ensemble de sérine-protéases exprimées dans de nombreux organes incluant les glandes salivaires, des organes à fonctions endocrines comme les gonades, la prostate, le sein ou l'endomètre, et aussi le système nerveux central (Yousef et Damatis, 2002). Leur expression est souvent associée à l'apparition de certains cancers.

Chez les rongeurs, les productions de kallibréines ont été localisées au niveau des cellules des GCT, et des canaux striés de la glande SM (Penschow et al., 1993). Plusieurs kallibréines ont été identifiées au niveau de la glande SM de rat, dont :

- **La KLK2**, encore appelée tonine qui est restreinte à la glande SM,
- **La KLK3** qui, avec la KLK7, la KLK8 et la KLK9, sont aussi exprimées dans la prostate - la KLK3 est plus connue sous le nom de PSA (Prostate Specific Antigen), un marqueur du cancer de la prostate,
- **La KLK4**, qui est à la fois marqueur du cancer du sein (Mangé et al., 2008), et qui s'exprime aussi dans les cellules lamellaires de la dent (Simmer et al., 2011).
- **La KLK1** qui, avec la KLK10, sont de vraies kallibréines tissulaires (Moreau et al., 1992).

La KLK1, qui dégrade les kininogènes en kinines (bradykinine ou kallidine), est connue sous l'appellation de système « kinine-kallibréine ». Ce système a deux origines, l'une plasmatique, l'autre glandulaire. Même s'ils agissent tous deux comme des kininogénases, ils ont des caractéristiques biochimiques différentes, le système plasmatique libérant un peptide, la bradykinine, tandis que le système glandulaire libère un décapeptide, la kallidine. Le système KLK1-Kininine joue un rôle dans l'inflammation, le contrôle de la pression artérielle, la coagulation et la douleur. Ses molécules sont secrétées au niveau des glandes salivaires majeures de l'homme et du rat (Brandtzaeg et al., 1976 ; Ørstavik, 1978 ; Ørstavik et al., 1979). Chez le rat, il est spécifiquement exprimé dans les canaux, mais pas dans les acini (Ørstavik, 1980).

Des études chez le rat montrent que la libération des kallibréines submandibulaires peut être endocrine et augmente de façon considérable suite à une stimulation α -adrénergique (Berg et al., 1985 ; Ørstavik et al., 1980).

Plusieurs évidences suggèrent qu'en plus de la production de peptides vaso-actifs au niveau local, les kallibréines tissulaires sont aussi impliquées dans plusieurs processus physiologiques, incluant le clivage de pro-hormones ou d'autres précurseurs comme l'EGF et le NGF au niveau de la glande salivaire (Rougeot et al., 2000).

3.2.3. Régulateurs du comportement alimentaire

3.2.3.1. La leptine

La leptine est une hormone qui joue un rôle important dans le contrôle de la prise alimentaire chez l'homme et chez le rat. Elle est sécrétée de façon abondante par les adipocytes. De Matteis et al ont montré, par immunohistochimie, la présence de la leptine et de son récepteur au niveau des canaux intralobulaires de la glande submandibulaire et de la parotide chez l'homme (De Matteis et al., 2002).

3.2.3.2. Le NPY

Le NPY est le neuropeptide le plus abondant du cerveau. Il est connu comme étant un puissant stimulateur du comportement alimentaire ; sa synthèse est inhibée par la leptine. Il a été démontré par immunohistochimie et radio-immunologie que la glande submandibulaire et la parotide contiennent du NPY au niveau de leurs acini, de leurs canaux et de leurs vaisseaux sanguins (Hauser Kronberger et al ,1992). Le rôle exact de ces peptides dans la glande SM reste encore inconnu mais ils semblent intervenir dans la régulation de la prise alimentaire.

4. Régulation hormonale des glandes salivaires

4.1. Expression de récepteurs hormonaux

Les glandes salivaires expriment la plupart des récepteurs hormonaux, qu'il s'agisse des récepteurs aux hormones sexuelles ou stéroïdiennes, mais aussi des hormones thyroïdiennes. Cependant, chacun d'eux s'exprime différemment en fonction de l'âge et du sexe. D'une manière générale, chez les mammifères, le récepteur des androgènes est le plus exprimé. Ainsi chez le rat, les glandes submandibulaires de rats contiennent le récepteur des androgènes, qui lie spécifiquement la testostérone (Yao et al., 2002). Toutefois, par immunohistochimie Ozono et al (1991) ont également montré la présence du récepteur à la progestérone dans la glande submandibulaire de rat avec une concentration similaire à celle trouvée dans les organes impliqués dans la reproduction.

Par ailleurs, les cellules épithéliales des glandes salivaires, de même que celles de la cavité buccale, expriment à leur surface les isoformes des récepteurs aux œstrogènes, ER α et ER β . D'un point de vue répartition histologique, la glande submandibulaire de rat possède des récepteurs œstrogénique au niveau des canaux (Campbell, 1990 ; Ozono et al., 1991) avec une prédominance du récepteur ER β ; le récepteur ER α , présent au state immature, disparaît peu à peu et est peu présent à l'âge adulte (Valimaa et al., 2004). D'une manière générale, les glandes salivaires expriment moins les récepteurs aux œstrogènes, comparativement à ceux des androgènes ou de la progestérone. De plus, leur expression varie selon le statut hormonal : chez la femme en post ménopause, le pourcentage d'expression des ARNm de l'ER β est plus faible que chez la jeune femme, et ce niveau d'expression varie aussi au cours du cycle menstruel. Les œstrogènes sont donc en mesure de moduler la quantité des ER β au niveau de la glande salivaire: on parle d'autorégulation hormonale (Välimaa et al., 2004).

Il a été aussi démontré la présence du récepteur des glucocorticoïdes au niveau des GCT de la glande SM de rat (Antakly, 1991), ainsi que des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (Arancibia et Assenmacher, 1985). La présence de tous ces récepteurs hormonaux est à relier aux effets des hormones sur la morphogénèse et le potentiel sécrétoire des glandes salivaires.

4.2. Dimorphisme sexuel

Chez les mammifères, les glandes salivaires majeures présentent un dimorphisme sexuel plus ou moins marqué selon les espèces, mais qui traduit bien l'influence des hormones sexuelles sur la morphogénèse et sur les sécrétions glandulaires.

Chez le rat, ce dimorphisme sexuel a été analysé la première fois par Lacassagne en 1940 sur des glandes submandibulaires de souris, puis d'autres auteurs ont suivi (Bueker, 1965 ; Jayasinghe, 1990 ; Hanker, 1980 ; Junqueira, 1948 ; Mudd et White, 1975). Ce dimorphisme sexuel est très marqué chez les rongeurs (Pinkstaff, 1998). Il porte sur la structure des GCT qui apparaissent plus larges et plus développés chez les rats mâles que chez les femelles. Cette différence est décrite comme étant dépendante des androgènes mais les androgènes ne sont pas les seules hormones influençant les GCT ; le développement et le maintien des tubules granulaires dépendent de l'interaction de plusieurs hormones, sexuelles, thyroïdiennes et adrénocorticoïdes (Grad et Leblond, 1949).

Le dimorphisme sexuel concerne aussi des paramètres biochimiques. Ainsi la synthèse de polypeptides comme l'EGF et le NGF est plus importante chez les mâles que chez les femelles. Par exemple, la concentration d'EGF chez le rat mâle est deux fois plus

élevée que chez les femelles et dix fois plus élevée chez la souris mâle que chez la souris femelle. (Lyon et al., 1973 ; Barthe et al., 1974).

Chez l'homme, le dimorphisme sexuel des glandes salivaires est également marqué et se répercute sur certaines pathologies des glandes salivaires. Ainsi le syndrome sec touche davantage les femmes (Konttinen et al., 2006).

4.3. Morphogenèse et plasticité structurale de la glande SM

Les glandes salivaires, en particulier les glandes submandibulaires sont sensibles aux transformations physiologiques, et leur structure varie en fonction de l'âge et du sexe (Scott, 1977 ; Sashima, 1986) et d'une espèce à une autre (Pinkstaff, 1980).

A l'image des autres glandes, les structures sécrétrices des glandes salivaires peuvent évoluer en fonction des concentrations en hormones circulantes, et ceci a été très étudié chez le rongeur dans les années 1950. Ainsi, l'administration de testostérone ou d'androgènes induit une hypertrophie des GCT chez des rates normales ou ovariectomisées : l'épithélium devient aussi large et même plus large que celui des rats mâles Kronman et Chauncey, 1964.

A l'inverse, la castration chez le mâle abolit le dimorphisme sexuel par une régression des éléments granulaires alors que les œstrogènes et la progestérone induisent une augmentation des aires des GCT chez des rates ovariectomisées (Rins de David, 1990). Cependant les études portant sur l'effet histologique des œstrogènes sont assez contradictoires. Shafer et Muhler (1953) rapportent une diminution des aires et du nombre des GCT suite à une injection d'œstradiol à 10 mg pendant 17 semaines (30^{ème} jour au 117^{ème} jour après la naissance). Liu (1967) met en évidence, également, une diminution de la taille et du nombre des GCT au niveau de glandes SM de rates femelles suite à des injections de différents types d'œstrogènes (estrone, estriol et œstradiol) à la dose 0,5 mg pendant 119 jour (du sevrage jusqu'à l'âge adulte). Un peu plus tard, Liu et al (1969) ont retrouvé ces mêmes résultats avec des doses encore plus faibles d'œstradiol (3, 6, 12 ou 24 µg). Cependant Flynn et al en 1983 montrent une augmentation des aires des GCT au niveau des glandes SM de femelles adulte (90 jours) suite à l'implantation sous cutanée de pastilles de 25mg de 17 β-œstradiol.

La comparaison entre ces différentes expérimentations reste difficile du fait de conditions expérimentales différentes, incluant le dosage des hormones, l'âge des animaux, le sexe des animaux et le mode d'administration.

Prises ensemble, ces données prouvent que les hormones sexuelles sont capables de modifier sélectivement la structure de la glande SM et que celle-ci présente une certaine plasticité. Dans le même sens, De Rijk (2003) a trouvé qu'un traitement chronique de 6 mois avec un stéroïde de synthèse qui combine des propriétés oestrogéniques et progestatiques provoquait une hyperplasie du système canalaire chez le rat. De plus, il existe des interactions et des connections hormonales entre la glande SM et l'hypophyse puisque la testostérone, combinée avec l'hormone thyroïdienne, est capable de restaurer la morphologie de la glande submandibulaire d'un rat hypophysectomisé (Kronman et Chauncey, 1964), et qu'inversement, une ablation des glandes submandibulaires entraîne une diminution de la LH associée à une perte de fertilité (Boyer et al 1991).

4.4. Débit salivaire et sécrétions exocrines

Les sécrétions des glandes salivaires varient au cours de l'âge et en fonction du sexe, témoignant là encore, de l'intervention des hormones sexuelles dans les processus de régulation. Mais plusieurs études expérimentales montrent que l'ensemble du système endocrinien participe dans la régulation des fonctions exocrines des glandes salivaires. C'est le cas de la plupart des enzymes sécrétés par voie exocrine dans la salive, en particulier au niveau des GCTs de glandes submandibulaires stimulées par des androgènes (Treister et al., 2005) ; Les androgènes semblent aussi contrôler l'activité de l' α -amylase : Gresik (1975) montre que l'activité α -amylase des SM de rats mâles adultes est plus importante que celle des femelles. Selon une étude sur la parotide, cette même enzyme est également régulée par les hormones thyroïdiennes (Ostuni et al., 2003).

4.4.1. Influence du statut hormonal

4.4.1.1. Dimorphisme sexuel

Plusieurs travaux réalisés chez l'homme et chez l'animal ont mis en évidence que la qualité et la quantité de salive varient de façon considérable en fonction du sexe. Percival et al (1994) ont constaté que le taux moyen du flux salivaire chez les femmes était significativement plus bas que chez les hommes, à la fois en conditions non stimulées et stimulées. Les hormones sexuelles féminines (spécifiquement les oestrogènes) ont été considérées comme le facteur essentiel de cette différence entre les deux sexes. Plusieurs autres études ont révélé des différences significatives entre les sexes, avec des débits salivaires chez les femelles sensiblement inférieurs à ceux des mâles (Bergdahl, 2000; Dodds et al., 2005 ; Dowd, 1999).

4.4.1.2. Cycle menstruel et gestation

Plusieurs observations au cours de la grossesse et du cycle menstruel font état d'une action des hormones féminines sur les fonctions salivaires. D'autre part, Salvolini et al (1998) ont rapporté une augmentation de la teneur en protéines totales de la salive, une augmentation de l'activité alpha amylasique, et une diminution de la concentration en calcium et en phosphore pendant la grossesse. Laine (2002) a décrit une diminution significative du pH et du pouvoir tampon de la salive durant la grossesse. Quelques études évoquent les effets du cycle menstruel sur les productions salivaires. Des modifications de la composition salivaire (taux de glucose, éléments minéraux) et du pH seraient fonction des taux circulants d'œstrogènes et de progestérone, ces fluctuations n'apparaissant pas chez les femmes soumises à un traitement contraceptif (Prosser et Hartmann, 1983). Des liens peuvent également être faits entre la composition salivaire et les modifications de la préférence au sucré/salé au cours du cycle. Durant le cycle menstruel, la composition de la salive varie aussi, avec une augmentation de la concentration en calcium, phosphate et sodium pendant l'ovulation et une augmentation de la teneur totale en protéines et de l'activité amylasique (Maier et al., 1979). Les variations observées pendant le cycle menstruel et la grossesse sont d'autres preuves de l'implication des hormones féminines.

Dans le même sens, d'autres études ont mis en évidence une diminution de la sécrétion salivaire chez les femmes ménopausées et suggèrent que ces modifications salivaires joueraient un rôle dans l'augmentation de la fréquence des caries après la ménopause (Friedlander, 2002; Streckfus et al., 1998).

4.4.1.3. La sénescence

Le vieillissement des glandes salivaires se traduit par de nombreuses altérations histologiques qui consistent en une réduction du nombre d'acini et une augmentation du pourcentage des tissus adipeux et fibreux. Par contre, aucun changement n'est observé quant au nombre de canaux (Scott, 1977; De Wilde et al., 1986). Ces altérations histologiques des glandes salivaires suggèrent que la xérostomie (sécheresse buccale) peut être une conséquence naturelle du vieillissement.

Une étude menée sur un échantillon conséquent d'individus dont le profil démographique et les problèmes de santé étaient représentatifs de la population générale, a montré qu'il existe bien une association entre âge et apparition d'altérations fonctionnelles salivaires (Dodds et al., 2005). D'autres investigations ont rapporté qu'il existe bien une réduction du débit salivaire avec l'âge (Percival et al., 1994 ; Navazesh et al., 1992) (Figure

13). Ces résultats confirment l'hypothèse que, dans une population générale, la sécrétion salivaire diminue avec l'âge.

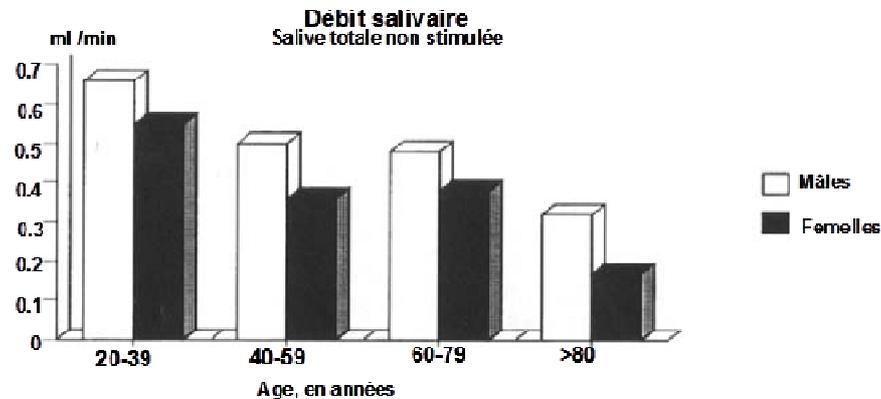


Figure 13 : Réduction du débit salivaire avec l'âge (Vissink et al., 1998 d'après Percival et al., 1994).

Le vieillissement modifie aussi la composition de la salive. Nagler et Hershkovich (2005) montrent que la concentration en électrolytes chez des sujets humains sains (à l'exclusion des personnes ayant une xérostomie, un cancer, une hypertension) augmente avec l'âge avec des effets plus marqués pour les ions K^+ et Cl^- . La composition en protéines totales augmente aussi de façon significative avec une augmentation de l' α -amylase salivaire, du lysozyme, de l'albumine et des IgA (Figure 14)

Concentration	Total (n = 76) ^a	20-30 ans (n=23)		70-86 ans (n=22)		P (t-test)
		Moyenne	S.E.M.	Moyenne	S.E.M.	
Na^+ (mmol/l)	0.17	9.52	0.86	12.56	1.50	0.10, NS
K^+ (mmol/l)	0.58	19.20	0.82	27.78	1.44	0.0001, sig
Cl^- (mmol/l)	0.56	19.70	1.07	29.50	1.59	0.0001, sig
Ca^{4+} (mg/dl)	0.13	3.45	0.43	5.15	0.97	0.10, NS
Protein (mg/dl)	0.50	49.80	5.05	93.40	10.66	0.0017, sig
Amylase (U/l)	0.40	748	103	1476	198	0.0014, sig
Lysozyme (mg/ml)	0.30	10.0	2.15	26.13	4.49	0.0003, sig
Albumin (mg/dl)	0.46	3.97	0.76	13.5	2.04	0.0002, sig
IgG (mg/dl)	0.25	0.24	0.10	0.50	0.19	0.26, NS
IgM (mg/dl)	0.03	0.12	0.11	0.17	0.17	0.80, NS
IgA (mg/dl)	0.30	21.12	1.25	27.58	4.20	0.16, NS
Secretory IgA (mg/dl)	0.52	326	28.4	572.5	47.8	0.0001, sig

Figure 14 : Modification de la composition salivaire avec l'âge (Nagler et Hershkovich,2005)

Les mucines salivaires diminuent aussi avec l'âge chez des sujets sains (Denny et al., 1991). La MG-1 diminuerait de 75% et la MG-2 de 10%. Cette diminution des mucines au niveau de la salive peut avoir des implications cliniques puisqu'elle diminuerait la viscosité de la salive (Van Der Reijden et al., 1993). Chez les femmes une diminution des kallibréines

salivaires (provenant des glandes submandibulaires) en fonction de l'âge a été aussi rapportée (Jenzano et al., 1992).

La diminution du débit salivaire avec l'âge a été démontrée aussi chez le rat avec une augmentation concomitante de la teneur en protéines totales (Bodner et Gorsky, 1996).

4.4.2. Influence de facteurs exogènes

4.4.2.1. Mastication et stimuli physiques ou sensoriels

Plusieurs études se sont intéressées à l'effet matrice de la nourriture et d'autres stimuli sur le débit et la composition salivaire.

En 1889, Pavloff découvrait que la sécrétion de salive pouvait être un réflexe conditionné par un stimulus sensoriel lié à la nourriture, comme la vue ou l'odeur de l'aliment, le son de la cloche au moment du repas, etc.

Lagerlöf et Dawes (1985) ont montré qu'une solution de sucrose entraîne rapidement une augmentation considérable du débit salivaire. Dans le même sens, une solution d'acide citrique provoque une forte augmentation du débit salivaire chez des sujets humains sains (Martin et Pangborn, 1971).

Chacun a pu constater que la sécrétion de salive pouvait être stimulée par la pression ou la mastication (chewing-gum). La mastication de pain et de céleri provoque aussi une augmentation du débit salivaire avec une augmentation de la concentration en α -amylase (Mackie et Pangborn, 1990). Les auteurs pensent que c'est la texture physique de l'aliment qui influence le débit salivaire et non sa composition.

Une autre étude étudiant les effets d'un jeûne de huit jours chez un groupe de femmes en bonne santé révèle une importante diminution du flux salivaire avec une diminution de la concentration en phosphates et de l'activité du lysozyme (Johansson et al., 1984) à relier à l'absence de stimulus mécanique, physique et chimique.

4.4.2.2. Radiothérapie

Une étude a montré que les patients traités par radiothérapie (40-52 Gy) pour des cancers de la tête et du cou, ont un flux salivaire qui s'abaisse jusqu'à 40% de la valeur initiale pendant l'irradiation, pour retourner 18 mois après la fin du traitement à 72% de sa valeur initiale. Les concentrations de protéines totales, de peroxydases et d'IgA salivaires sont fortement augmentées pendant le traitement et les 6 mois suivants, et se normalisent après 18 mois (Funegard, 1994). D'autre part, les glandes parotides exposées à des doses

supérieures à 60 Gy subissent des dommages définitifs sans possibilité de récupération de l'hypofonction salivaire. L'effet des rayonnements sur la fonction salivaire est une diminution importante des flux parotidiens et submandibulaires ; la détérioration se continue progressivement tout au long du traitement jusqu'à ce que les débits ne soient plus mesurables. Il peut y avoir une légère amélioration des symptômes de xérostomie après quelque temps, cependant, la xérostomie persiste pendant tout le reste de la vie de l'individu, affectant gravement sa qualité de vie (Kielbassa et al., 2006).

4.4.2.3. Médicaments

Tous les médicaments et substances pouvant interférer sur le système nerveux central et périphérique, ont une influence sur la production de salive, entraînant soit une hypersalivation, soit une hyposalivation. Dans les deux cas, cela représente une source d'inconfort pour le patient. L'hypertrophie ou l'hyperplasie du tissu glandulaire est également possible, ce qui mène à une modification de la composition salivaire. La prise de ces médicaments peut entraîner l'apparition de douleurs au niveau des glandes salivaires, d'une modification de la perception du goût des aliments et d'une halitose (mauvaise haleine).

- Médicaments entraînant une hyposalivation :

Les traitements qui bloquent le système nerveux, provoquent toujours une réduction du débit salivaire comme effet secondaire. Il en est ainsi des traitements qui ont un effet anticholinergique direct (bloqueurs muscariniques, antiparkinsoniens) ou indirect (antidépresseurs, antihistaminiques, antipsychotiques, etc.). Les molécules ayant un effet anti- α 1-adrénergique ou anti- β 1-adrénergique provoquent aussi une réduction du débit salivaire. Elles modifient plutôt la composition de la salive, notamment par une diminution du taux de protéines (Aps et al., 2005).

- Médicaments entraînant une hypersalivation :

L'augmentation du débit salivaire est toujours due à une augmentation du taux de neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine et la noradrénaline au niveau des synapses. Les médicaments provoquant l'hypersalivation utilisent donc des agonistes sympatho-adrénergiques ou des parasymphomimétiques. Citons comme exemples l'arécoline, la méthacoline, la muscarine, la pilocarpine comme molécules parasymphomimétiques et la dobutamine, le prenalterol, l'isoproternol, le salbutamol, la méthoxamine comme molécules sympatho-adrénergiques (Aps et al., 2005).

- Médicaments entraînant un changement de goût et une halitose :

Beaucoup de molécules sont responsables d'un changement au niveau de la perception gustative comme par exemple la doxycycline et la scopolamine, qui provoquent l'incapacité de différencier entre le goût salé et le goût acide. Les molécules telles que l'azelastine, la tetracycline, le metronidazol, peuvent entraîner un goût métallique et un goût amer dans la bouche ; d'autres médicaments sont responsables dans quelques cas d'une perte de goût comme le carbamizol, la pénicillamine, le bléomycine et le captopril (Aps et al., 2005). L'halitose, quant à elle, peut être due à des médicaments contenant essentiellement des sulfures (Mott et Leopold, 1991).

4.4.2.4. Stress et émotions

Qui n'a pas expérimenté l'effet du stress sur la sécheresse buccale ? Plusieurs études menées sur la parotide montrent que les sécrétions salivaires sont également sensibles aux états émotionnels. On note une hyposalivation en cas de stress et d'état dépressif, et inversement une hypersalivation en cas d'excitation (Costa et al., 1980 ; Moret et al., 1993).

4.4.3. Influence de certaines pathologies**4.4.3.1. Syndrome de Gougerot-Sjögren**

Le syndrome de Gougerot-Sjögren primitif est une maladie auto-immune qui affecterait environ 0,2 % de la population, avec une prévalence féminine forte. Ce syndrome peut également être secondaire à d'autres maladies auto-immunes glandulaires. Cette maladie est caractérisée par une infiltration lymphoïde de toutes les glandes exocrines (glandes salivaires, lacrymales, digestives, vaginales, etc.) et par la présence de nombreux auto-anticorps sériques. Les manifestations cliniques de ce syndrome ont fréquemment des répercussions sur la qualité de vie des malades. La manifestation principale de cette pathologie est un syndrome sec. Il est quasi constant, intéressant les régions buccales (xérostomie) et/ou oculaires (xérophtalmie). La diminution du flux salivaire peut aller jusqu'à l'asialie complète. La composition salivaire en ions des patients présente aussi des modifications, surtout une augmentation de la concentration des ions Na⁺ et Cl⁻. Suite aux réactions inflammatoires engendrées par la maladie, d'autres changements ont été notés au niveau de la composition salivaire avec une diminution de la concentration totale en protéines, en amylase, en lysozyme et en IgA (Atkinson et al., 1990).

Plus récemment, quelques études mentionnent des liens avec un défaut d'expression des hormones sexuelles dans la maladie (Fujitake et al., 2011; Suzuki et al., 2002) et curieusement, cette pathologie peut être soulagée par des traitements par des androgènes.

4.4.3.2. Pathologies métaboliques

- **Diabète** : Les personnes souffrant de diabète présentent une xérostomie plus fréquente que les personnes saines (Moore et al., 2001). L'âge, le sexe et la durée du diabète ne semblent pas être liés à l'intensité de cette hyposalivation (Chavez et al., 2000). En ce qui concerne la composition de la salive, Mata et al (2004) ont montré que les patients souffrant de diabète ont une activité sécrétoire salivaire réduite, et une concentration en Ca^+ élevée, contrairement à la concentration en Mg^{2+} , Zn^{2+} et K^+ qui sont réduites par rapport aux sujets sains.

- **Obésité** : Une autre étude sur le comportement alimentaire a mis en évidence que, chez des enfants en surpoids et obèses, il existe une altération de la composition de la salive par rapport à des enfants sains avec une diminution de la concentration en phosphates, une augmentation de l'acide sialique, une augmentation de la teneur en protéines salivaires et une diminution de l'activité peroxydase, sans aucune variation du débit salivaire (Pannunzio , 2010).

- **Insuffisance rénale chronique** : Plus de 50% des personnes sous hémodialyse souffrent d'hyposalivation, d'altération du goût et de douleurs buccales. Une augmentation de la concentration en urée salivaire a été trouvée, ce qui confère un pH salivaire plus élevé chez ces patients (Kho et al., 1999). La revue de Bossola et Taza (2012) évoque une perturbation du système rénine-angiotensine chez les patients sous hémodialyse qui provoquerait une xérostomie.

- **Hypothyroïdie** : La thyroxine semble avoir un effet sur le débit et la composition salivaire (Johnson et al., 1988). En effet, l'hyperthyroïdisme augmente le débit salivaire, la concentration du potassium et diminue la concentration totale en protéines et en calcium (Ford et al., 1997).

4.4.3.3. Maladies infectieuses

D'autres pathologies influencent soit le débit, soit la composition salivaire, comme la maladie du greffon contre l'hôte, la mucoviscidose, et le VIH (Devoize et Dallel, 2010).

4.5. Fonctions endocrines

Tout comme les sécrétions exocrines, les sécrétions endocrines des SMG sont également contrôlées par les hormones sexuelles, les hormones thyroïdiennes, et les adrénocorticoïdes. La plupart des protéines salivaires (kallitréines, protéinases...) sont régulées par les androgènes (Treister et al., 2005), et leur expression varie en fonction de l'âge et du sexe (Maier et Menstell, 1986). De même, l'implication des androgènes dans la production d'EGF et de NGF au niveau des GCT des glandes submandibulaires de rongeur est depuis longtemps établie (Byyny et al., 1974 ; Tuomela et al., 1990 ; Gubits et al., 1986).

La progestérone, la 5 alpha-dihydrotestostérone et l'hormone thyroïdienne induisent également l'expression de l'EGF chez des souris mâles. Par contre, l'œstradiol seul n'a aucun effet sur l'expression de l'EGF (Maruyama, 1993).

Le rôle des oestrogènes sur l'expression de ces peptides biologiquement actifs a été peu décrit. Cependant, on sait qu'ils contrôlent l'expression des facteurs de croissance (EGF, NGF) et d'autres protéines (lactoferrine) dans divers tissus périphériques. Cependant, une étude récente mentionne leur action conjointe avec l'insuline sur l'expression d'un autre facteur de croissance, l'IGF-1, dans les submandibulaires de rats diabétiques (Yashida et al., 2011).

4.6. Conséquences physiologiques de l'ablation de la glande SM

Les sécrétions endocrines des glandes salivaires interviennent dans les processus de développement, mais certaines, comme l'EGF et le NGF, participent aussi activement à l'équilibre du système endocrinien en agissant sur les sécrétions hypophysaires d'ACTH et de GH, ou sur la sécrétion de l'hormone thyroïdienne par exemple, faisant des glandes salivaires un membre actif du système endocrinien (Arancibia et Assenmacher, 1985).

Des expériences d'ablation de la glande submandibulaire montrent des perturbations au niveau de tout l'organisme, ce qui révèle le rôle primordial des fonctions endocrines de cette glande amphicrine au niveau de la régulation de nombreux processus physiologiques.

4.6.1. Développement de la glande mammaire et lactation

Okamoto et Okai (1984) ont rapporté que l'ablation de la glande SM de souris femelles vierges provoquait, après la période de gestation, une diminution du développement de la glande mammaire et de sa capacité à produire du lait maternel, avec, pour conséquence, une augmentation de la mortalité de la progéniture. Ils ont montré aussi qu'une administration de l'EGF à ces souris sialo-adenectomisées rétablissait la production de lait. Cette étude prouve l'importance de l'EGF provenant de la glande SM dans le développement

de la glande mammaire lors de la lactation. Une autre étude a mis en évidence le lien direct entre les deux glandes (Sheffield et Welsch, 1987) : la sialo-adénectomie de jeunes souris femelles réduit le développement de la glande mammaire et le taux d'ADN mammaire, et ceci, même chez les animaux traités avec l'œstradiol et la progestérone. Seule l'administration quotidienne d'EGF a permis de corriger partiellement l'atrophie des glandes mammaires.

4.6.2. Gamétogenèse et reproduction masculine

Il a été démontré que la sialo-adénectomie provoque une réduction du nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme (Tsutsumi et al., 1986; Russell et al., 1990). En se basant sur ces résultats et sur d'autres études, l'existence d'un axe glande submandibulaire-gonade a été suggéré par Tsutsumi et al (1986), et Noguchi et al (1990).

Une étude sur le long terme a permis d'appuyer cette hypothèse. Reyes et Wakasugi (1995) ont en effet montré que la sialo-adénectomie effectuée sur des souris immatures provoque ensuite une diminution de la production de spermatocytes au niveau des tubes séminifères, ainsi qu'une diminution significative du taux de fécondation par rapport aux témoins non opérés.

4.6.3. Conséquences sur d'autres organes périphériques

- **Développement osseux et dentaire** : L'ablation des glandes SM a des conséquences sur le développement d'autres organes comme les dents. Ainsi, l'étude de Dolce et al (1994) a révélé, chez des rats sialoadénectomisés, une diminution du remodelage osseux dans la zone de la bouche et cette altération se trouve corrigée par l'administration d'EGF.

- **Appareil reproducteur féminin** : Tsutsumi et al (1993) ont montré que la sialo-adénectomie perturbe la croissance de l'utérus chez des souris femelles en diminuant leur poids, avec une possible conséquence sur la diminution de leur fertilité.

- **Développement de l'épithélium cutané** : Inalöz et al (2000) ont trouvé que l'ablation des glandes SM des rates femelles en gestation provoquait des atrophies au niveau de la peau des nouveau-nés et ces altérations sont encore plus accentuées en présence d'un anti-androgène comme le flutamide.

- **Perceptions gustatives** : Les glandes SM semblent jouer un rôle important au niveau de la perception gustative, puisque la sialo-adénectomie entraîne une diminution

importante des bourgeons gustatifs et cet effet est corrigé par ajout d'EGF (Morris-Wiman et al., 2000).

- **Parenchyme du foie** : Viladrich et al (2008) ont révélé que l'ablation des glandes SM chez des souris provoquait une altération du foie et empêchait le renouvellement des cellules hépatiques.

- **Fonctions hypophysaires** : L'équipe de Boyer a retrouvé une diminution des taux hypothalamiques de TRH, sans modification des taux sanguins de TSH circulants après ablation des sous maxillaires chez le rat (Boyer et al., 1988).

5. Questionnement Scientifique

D'après cette revue de la littérature, la glande submandibulaire de rat apparaît donc comme un organe exprimant de nombreux récepteurs hormonaux au niveau duquel une régulation particulièrement fine par les hormones sexuelles fait apparaître un dimorphisme sexuel tant au niveau histologique que fonctionnel. Compte tenu de leur importance dans la régulation endocrine du développement et des fonctions d'autres organes (tractus génital, glande mammaire, bourgeons du goût, dents, os), on est en droit de supposer que ces glandes pourraient subir des altérations du développement ou présenter des modifications structurales et fonctionnelles capables d'induire des altérations importantes au niveau d'autres organes, lorsqu'elles sont exposées à des substances de type perturbateurs endocriniens, notamment des composés interférant avec les hormones sexuelles.

Dans l'optique de préciser la sensibilité des glandes salivaires aux xéno-hormones et les conséquences qui peuvent en découler, la glande sous maxillaire de rat apparaît comme un modèle expérimental de choix, d'une part, parce qu'elle est bien référencée dans la littérature, tant d'un point de vue morphogénique et fonctionnel que d'un point de vue régulation hormonale, d'autre part parce qu'elle est mieux individualisée que la parotide, de taille intermédiaire et facile d'accès chez le rongeur. Enfin, elle présente de nombreuses analogies de réponses avec la glande salivaire d'Homme, et chez le rat, ses fonctions endocrines et ses interactions avec les autres glandes endocrines sont particulièrement bien définies, ce qui conduit à la considérer comme un composant du système endocrinien.

Chapitre 2 La perturbation endocrinienne

1. Système endocrinien

Le système endocrinien contrôle et régule de nombreux processus physiologiques dont la reproduction, la croissance et le développement, la mobilisation des moyens de défense de l'organisme, le maintien de l'équilibre des électrolytes, des liquides et des nutriments dans le sang ainsi que la régulation du métabolisme cellulaire (Hiller-Sturmhofel et Bartke, 1996). Il constitue un des deux grands systèmes de communication de l'organisme, l'autre étant le système nerveux.

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

Le SE est constitué par des organes ou ensembles de cellules spécialisées dans l'élaboration d'hormones (messagers chimiques). Depuis la sécrétine, première hormone découverte par Bayliss et Starling (1902), régulant la sécrétion par le pancréas d'enzymes digestives, de nombreuses substances ont été identifiées. Elles ont pour propriété d'être sécrétées dans le sang par des glandes appelées glandes endocrines (Figure 15).

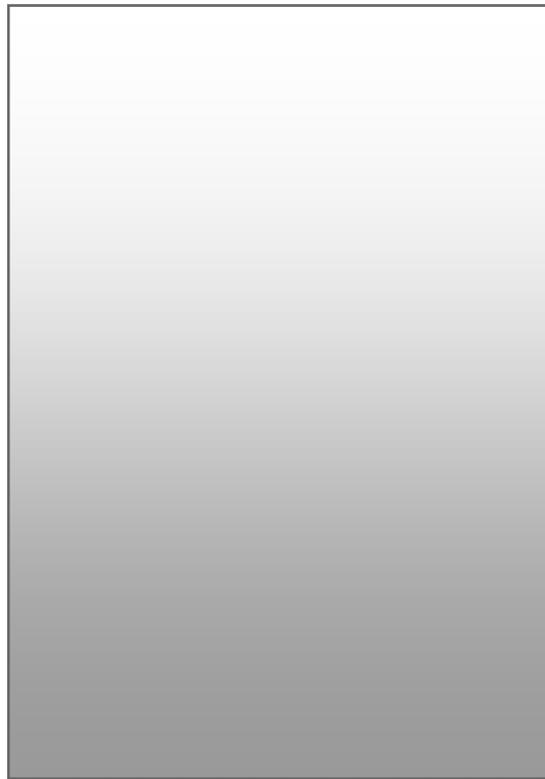


Figure 15 : Schéma du système endocrinien
(<http://sofia.medicalistes.org/spip/spip.php>).

Les hormones jouent un rôle essentiel dans la transmission de l'information entre les cellules ou les organes. Elles sont définies comme des substances chimiques que des cellules sécrètent dans le liquide interstitiel (extracellulaire) et qui passent dans la circulation sanguine pour agir à distance.

1.1. Classification des hormones

Bien que l'organisme produise des hormones très diverses, elles peuvent être classées en trois groupes selon leur nature biochimique :

– **Les hormones peptidiques** sont de taille et de structure très diverses. Cette classe d'hormones comprend les hormones produites par l'antéhypophyse, les parathyroïdes, le pancréas ainsi que les hormones activatrices de l'hypothalamus. Elles comprennent entre 3 acides aminés pour la TRH, et 191 acides aminés pour la GH. Certaines sont constituées de deux chaînes peptidiques comme la LH ou l'insuline. Elles agissent sur les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs protéiques transmembranaires qui servent de relais pour transmettre les signaux à l'intérieur de la cellule.

– **Les hormones stéroïdes** sont des lipides synthétisés à partir du cholestérol. Ces hormones hydrophobes traversent aisément les membranes plasmiques, et doivent se lier avec des protéines plasmatiques pour circuler dans le sang. Le complexe stéroïde-protéine est inactif, seule l'hormone stéroïde libre a une action endocrine. La protéine de transport ne libère l'hormone stéroïde qu'au niveau des capillaires sanguins qui irriguent les organes cibles. Elles pénètrent ensuite dans le cytoplasme de leurs cellules cibles, où elles se lient à des récepteurs intracellulaires de types cytoplasmique ou nucléaire. Elles regroupent les hormones sécrétées par les corticosurrénales et par les gonades.

– **Les hormones monoaminées** sont des molécules simples qui dérivent d'acides aminés, principalement de la tyrosine et du tryptophane, et sont donc de petite taille. Il s'agit entre autres de l'adrénaline, de la noradrénaline, de la dopamine et de la mélatonine. Comme les hormones peptidiques, elles circulent librement dans le sang et agissent sur les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires spécifiques.

1.2. Mode de sécrétion des hormones

Il existe différents modèles de sécrétion : un modèle *endocrine* qui désigne les hormones libérées dans la circulation générale à partir de glandes spécialisées pour agir sur des cibles distantes; et d'autres modèles de sécrétions qui permettent aux hormones d'agir sur leur site de production. On parle de sécrétion *paracrine* pour les hormones libérées à partir d'une cellule qui agit sur les cellules voisines; *autocrine* pour l'action négative ou positive de

l'hormone sur la cellule qui l'a synthétisée ; et le modèle *intracrine* pour désigner la formation d'hormones actives qui exercent leur action dans la cellule où la synthèse a eu lieu. La figure 16 illustre les différents types de sécrétion des hormones stéroïdes (Labrie et al., 1991 ; 1998). Ces productions locales peuvent résulter de la conversion de précurseurs : c'est le cas des androgènes qui sont transformés en œstrogènes par l'aromatase, une enzyme de conversion exprimée dans la plupart des tissus.

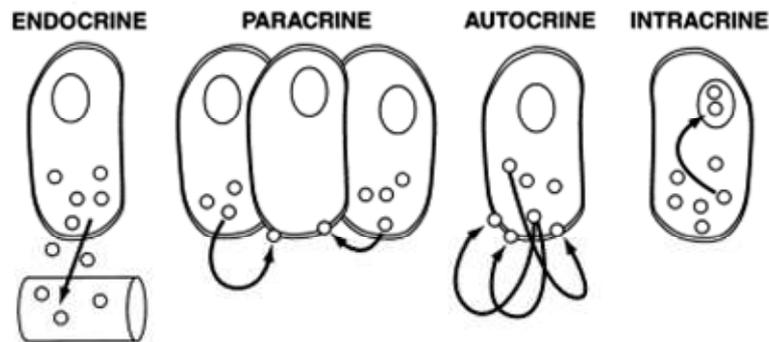


Figure 16 : Différents mode de sécrétion des hormones stéroïdes (Labrie , 1998).

1.3. Gouvernance de l'axe hypothalamo-hypophysaire

Les productions hormonales impliquées dans les grandes fonctions physiologiques sont sous la gouvernance de l'axe hypothalamus-hypophyse, lui-même en relation avec le système nerveux central d'une part, et d'autre part avec les principales glandes endocrines qui lui sont soumises (thyroïde, surrénales, gonades). Il agit aussi sur de nombreux organes non endocriniens et participe fortement à l'homéostasie corporelle (Figure 17). Situé à la base du cerveau, autour du 3^{ème} ventricule, l'axe hypothalamo-hypophysaire comprend plusieurs subdivisions qui ont chacune des fonctions propres.

1.3.1. L'épiphyse ou glande pinéale

Située à l'extrémité postérieure du toit du troisième ventricule cérébral, cette glande synthétise de la *mélatonine* à partir de la *sérotinine*, en présence de lumière. La mélatonine est sécrétée la nuit et contribue à régler l'horloge biologique du corps humain (Cassone et al., 1993). Cette hormone intervient également dans différents processus biologiques dont la reproduction (Reiter et al., 2009), la croissance cellulaire (Reiter et Fuentes-Broto, 2010) mais contrôle aussi le poids corporel et la balance énergétique (Barrenetxe et al., 2004).

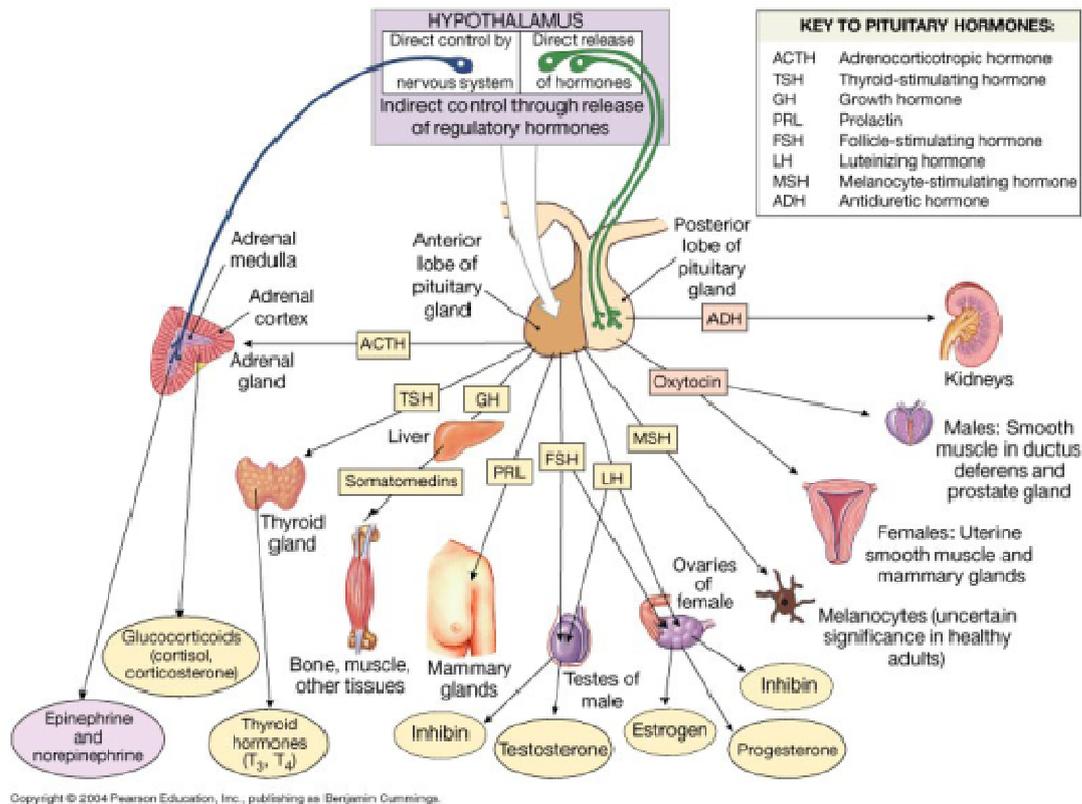


Figure 17 : Gouvernance de l'axe hypothalamo-hypophysaire (D'après Pearson Education, 2004).

1.3.2. L'hypothalamus

Formé par les parois du troisième ventricule et considéré comme lien entre le système nerveux et le système endocrinien, il produit deux hormones qui sont stockées dans le lobe postérieur de l'hypophyse avant d'être libérées dans le sang, l'hormone antidiurétique (ADH) ou *vasopressine*, et l'*ocytocine*.

- La *Vasopressine* influe sur l'équilibre hydrique et selon d'anciens travaux, elle serait aussi impliquée dans les sécrétions salivaires et la sécheresse buccale (Baisset et al., 1962 ; Iaremenco et al., 1969; Tanneau et al., 1989).

- L'*Ocytocine* a un rôle clé sur l'appareil reproducteur femelle car elle stimule la contraction des muscles lisses de l'utérus et celle des cellules myoépithéliales des glandes mammaires au moment de la lactation (Lohmeier, 2003).

La *vasopressine* et l'*ocytocine* sont aussi deux neuromédiateurs clé du comportement social, et elles interviennent notamment dans l'attachement maternel et dans la réaction au

stress. Au niveau des glandes salivaires, ils interviendraient dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium des parties sécrétoires (Valov et al., 1995)

L'hypothalamus sécrète aussi des *libérines*, ou « Releasing Hormones » qui régulent les sécrétions de l'hypophyse (Guillemin, 2005) dont les principales sont :

- *La gonadolibérine (GnRH ou LHRH)*. En phase de repos, cette hormone est libérée de façon pulsatile toutes les 30 à 120 minutes par les neurones du noyau arqué ou de l'aire pré-optique hypothalamique, en fonction de l'espèce. Sa stimulation induit une augmentation de la transcription de son propre gène, et des gènes codant pour les hormones FSH et LH au niveau de l'hypophyse.

- *La thyrolibérine (TRH)* stimule la sécrétion de la thyrotrophine (TSH);

- *La somatocrinine (GH-RH)* provoque la libération de l'hormone de croissance, tandis que la *somatostatine (GH-IH)* l'inhibe ;

- *La corticolibérine (CRF)* stimule la sécrétion de la corticotrophine qui agira sur les surrénales ;

- *La dopamine* inhibe la sécrétion de la prolactine, mais intervient également comme neurotransmetteur dans le SNC et contrôle le comportement.

Mise à part celle de la dopamine, les sécrétions des hormones hypothalamiques sont soumises à un phénomène de rétrocontrôle exercé par les hormones hypophysaires correspondantes, mais à notre connaissance, elles n'agissent pas directement sur les glandes salivaires, mais plutôt de manière indirecte via le contrôle des sécrétions pituitaires. La dopamine, à l'image de l'ocytocine et de la vasopressine, intervient également dans le contrôle des sécrétions salivaires (Abe et al 1982).

1.3.3. L'hypophyse

L'hypophyse, appelée aussi glande pituitaire, est située à la base du cerveau, logée dans la selle turcique. Elle est sous le contrôle de l'hypothalamus et est divisée en deux lobes aux fonctions bien distinctes :

- La neurohypophyse, qui correspond au lobe postérieur et est composée principalement de cellules gliales, d'axones et de terminaisons axonales. Ces dernières stockent deux hormones peptidiques synthétisées et libérées par les neurones hypothalamiques, l'ocytocine et l'ADH ; (Figure 17). La neurohypophyse ne fabrique pas d'hormones.

- L'adénohypophyse ou. antéhypophyse car elle correspond au lobe antérieur, produit et libère de nombreuses hormones. Six hormones adénohypophysaires, ayant chacune des effets physiologiques distincts sur l'organisme, ont été décrites (Figure 17).

Parmi elles, on distingue trois hormones trophiques, qui stimulent d'autres glandes endocrines, prolongeant ainsi l'axe hypothalamo-hypophysaire:

- **Les gonadotrophines** régissent le fonctionnement des gonades : la FSH stimule la production de gamètes (spermatozoïdes et ovules) tandis que la LH favorise la production *des oestrogènes et des androgènes*.
- **La thyrotrophine (TSH)** ou hormone thyroïdienne, est une glycoprotéine qui stimule le développement et l'activité endocrine de la thyroïde pour la sécrétion des hormones thyroïdiennes.
- **La corticotrophine (ACTH)** ou hormone corticotrope, amène la corticosurrénale à libérer les hormones corticostéroïdes formées à partir du cholestérol, et plus particulièrement les glucocorticoïdes, qui aident l'organisme à résister aux facteurs de stress.

Les trois autres hormones qui vont agir directement sur les tissus et certaines glandes exocrines sont :

- **L'hormone de croissance (GH)**, aussi appelée *somatotrophine*, qui est l'hormone protéique la plus abondante des hormones sécrétées par l'adénohypophyse. Bien que la GH provoque la croissance et la division de la plupart des cellules de l'organisme, ses principales cibles sont les os et les muscles squelettiques. Elle contrôle également quelques métabolismes dans de nombreux organes, dont le foie, l'intestin et le pancréas ; elle stimule la synthèse protéique, le catabolisme des graisses, et augmente le taux sanguin de glucose.
- **La mélanostimuline (MSH) ou mélanocortine**, qui dérive de l'ACTH par clivage enzymatique. La MSH agit notamment sur les mélanocytes de la peau, en induisant la synthèse de mélanine en réponse aux rayons UVA. Cependant, comme nous le verrons un peu plus loin, il existe aussi des isoformes de la mélanocortine produites dans l'hypothalamus et qui contrôlent la prise alimentaire (alpha MSH).
- **La prolactine (PRL)** est une hormone protéique semblable, du point de vue structural, à l'hormone de croissance. Elle agit de concert avec les hormones gonadiques dans le développement de la glande mammaire et son principal effet consiste en la stimulation et le maintien de la lactation. Cependant, elle intervient aussi comme neurotransmetteur, notamment dans les phénomènes de dépressions. Au niveau des glandes salivaires, elle induit la synthèse de protéines chez les patients atteints du syndrome sec (Steinfeld et al 2000).

1.3.4. Les hormones thyroïdiennes

La thyroïde ou glande thyroïde est la plus volumineuse des glandes purement endocrines chez l'être humain. Elle est située dans la partie antérieure du cou. Cette glande sécrète la triiodothyronine (T3), la thyroxine (T4) et la calcitonine.

- **Les hormones thyroïdiennes (T3 et T4)**, de structure similaire et contenant de l'iode, agissent sur les cellules de presque tous les tissus (hormis la rate, l'utérus et la glande thyroïde elle-même). Elles influent sur la croissance et le développement des tissus et agissent de concert avec les hormones sexuelles (O'Shea et Williams, 2002).

- **La calcitonine** est impliquée dans le métabolisme phosphocalcique et s'oppose à l'action hypercalcémiant des parathormones ; elle favorise le stockage du calcium dans les os.

1.3.5. Les hormones surrénaliennes

Elles sont synthétisées par les deux glandes surrénales coiffant chacune un rein, et ont une forme pyramidale aplatie. Durant le développement embryonnaire, les glandes surrénales se différencient en deux régions distinctes sur les plans structural et fonctionnel : un grand cortex surrénal situé en périphérie qui constitue 80 à 90% de la masse de la glande, et une petite médullosurrénale localisée au centre (Rosol et al., 2001). Chaque section a des fonctions endocrines propres. Ces hormones méritent une attention particulière car elles agissent sur les glandes salivaires.

- **Les Minéralocorticoïdes** dont l'aldostérone est la plus abondante (~95%), ont pour rôle principal de maintenir l'équilibre des ions sodium. L'aldostérone stimule en premier lieu la réabsorption des ions sodium de l'urine (s'accompagnant de rétention d'eau) sur la partie distale des tubules rénaux, mais elle agit aussi sur les canaux de la glande salivaire SM, en augmentant l'absorption des ions sodium (Young et al., 1967).

- **Les Glucocorticoïdes** influent sur le métabolisme de la plupart des cellules et contribuent à leur résistance face au stress. De plus, ils maintiennent l'équilibre du volume sanguin en empêchant l'eau de pénétrer dans les cellules et contribuent à la stabilisation de la glycémie. Ils sont aussi impliqués dans la différenciation des pro-acini en acini et dans la stimulation de la sécrétion de granules au niveau de la glande SM fœtale (Inukai et al., 2008).

- **L'adrénaline et la noradrénaline** produites par les médullosurrénales induisent des effets identiques : augmentation de la fréquence cardiaque, vasoconstriction et augmentation de la pression artérielle, dérivation du sang vers les organes vitaux, augmentation de la glycémie, stimulation de la respiration et broncho dilatation (Kvetnansky et al., 2009). Ces deux hormones agiraient aussi au niveau de la glande submandibulaire en

augmentant la consommation d'oxygène de la glande SM en présence d'ions calcium et sodium (Sakamoto et al., 1981).

Des travaux récents soulignent l'action stimulante du stress sur la production de neurotrophines tels le NGF par les glandes salivaires et les interactions avec les hormones thyroïdiennes et les hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire-adrénergique dans les désordres neurologiques et comportementaux (Saruta et al 2010).

1.3.6. Les hormones gonadiques ou sexuelles

Les hormones sexuelles sont des hormones stéroïdiennes majoritairement sécrétées par les gonades. Ces glandes génitales, qui fonctionnent par paires, sont des glandes amphicrines qui sécrètent les gamètes par leurs fonctions exocrines (ovules, spermatozoïdes), et les hormones par leur fonctions endocrines.

- **Les androgènes** caractérisent les hormones sexuelles mâles et sont majoritairement synthétisés dans les testicules par les cellules de Leydig qui assurent la stéroïdogénèse. La testostérone est l'androgène le plus actif, présent à un taux 20 fois plus élevé chez l'homme que chez la femme. Chez la femme, ils sont aussi sécrétés par les glandes surrénales ou l'ovaire ; ils sont impliqués dans la mise en place des caractères sexuels secondaires. La production excessive de ces hormones peut entraîner une masculinisation des femmes et une puberté précoce chez le jeune garçon.

- **Les œstrogènes et la progestérone** caractérisent les hormones sexuelles femelles et sont produites de manière cyclique par les ovaires. L'œstradiol est l'œstrogène principal, et il est plus abondant chez la femme que chez l'homme. Egalement impliqué dans le dimorphisme sexuel, un excès entraîne une féminisation des mâles et une puberté précoce chez les femelles. Le testicule en produit également, de même que la plupart des tissus qui possèdent une aromatasase, enzyme qui convertit les androgènes en œstrogènes.

Les oestrogènes et les androgènes jouent un rôle important dans la fonction de reproduction. Ils gouvernent aussi les premières étapes de différenciation cellulaire et tissulaire chez l'embryon, agissant de concert avec les autres hormones trophiques. En raison de leur rôle important dans la croissance et le développement, et le maintien de l'homéostasie corporelle, nous leur accorderons une place particulière dans le point 2 de ce chapitre. (cf §2- les hormones sexuelles).

1.4. Hypothalamus et métabolisme énergétique

L'hypothalamus est également en relation étroite avec les organes périphériques qui contrôlent le métabolisme énergétique et la prise alimentaire via la sécrétion d'hormones ou de neuropeptides (Figure 18). Ces régulations mettent en jeu deux catégories de cellules neuronales au niveau du noyau arqué dont l'activité contrôle l'appétit selon deux voies de régulation, la voie anorexique, qui inhibe l'appétit, et la voie orexique qui le stimule. Les organes périphériques impliqués sont le pancréas, le tissu adipeux et le tube digestif.

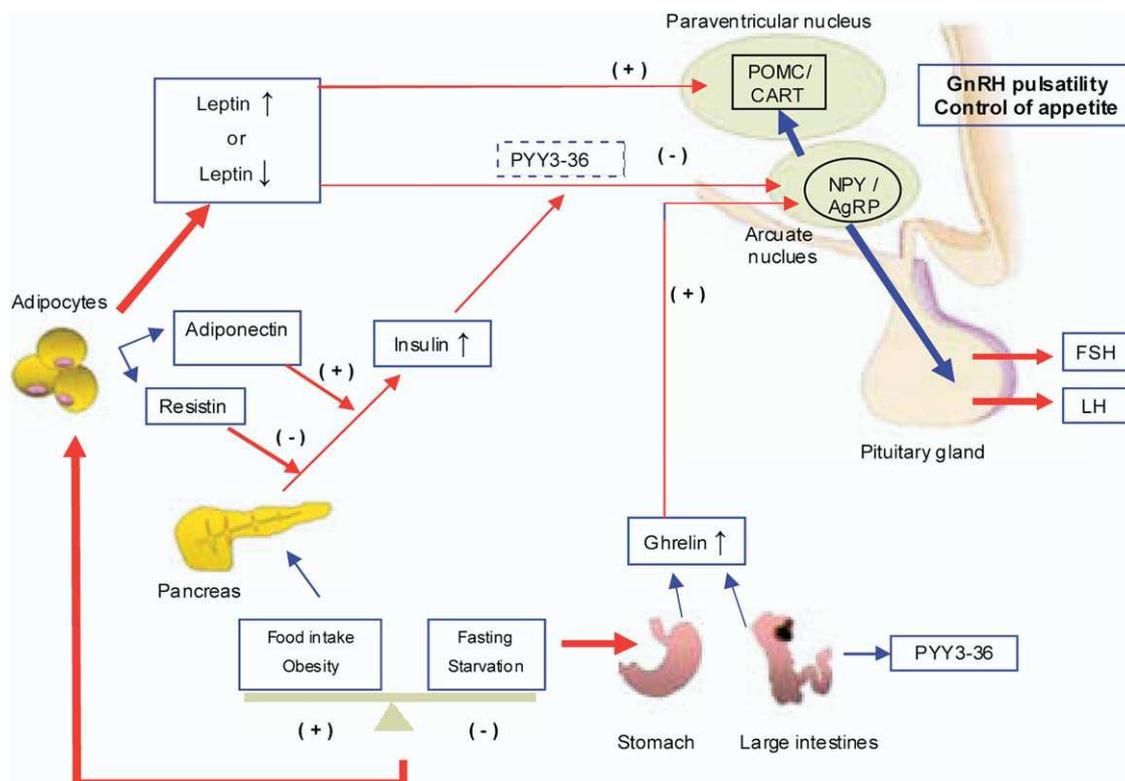


Figure 18 : Hypothalamus et contrôle endocrinien du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire (Budack et al 2006).

NPY: neuropeptide Y; AgRP: agouti-related peptide; CART: cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide; POMC: Pro-opio-melanocortin.

- **L'insuline et le glucagon** sont synthétisés par le pancréas et interviennent dans le contrôle de la glycémie. L'insuline est une hormone hypoglycémisante qui agit sur les métabolismes glucidique, protéidique et lipidique, augmentant le niveau d'utilisation du glucose et diminuant son taux sanguin. Le glucagon, quant à lui, est une hormone hyperglycémisante qui provoque la libération du glucose du foie. Répartis dans le pancréas, les îlots de Langerhans contiennent deux grandes populations de cellules endocrines : les cellules α qui synthétisent le glucagon, et les cellules β , plus nombreuses, qui élaborent

l'insuline. Rappelons que les glandes salivaires sont également capables de synthétiser des analogues de ces deux hormones, le glucagon-like growth factor et l'insuline like growth factor.

- **La leptine, l'adipokine et la résistine** sont des hormones importantes du tissu adipeux. La leptine contrôle la prise alimentaire, tandis que les deux autres contrôlent la glycémie. Toute modification de la masse grasse s'accompagne d'une modification de production de ces peptides qui vont jouer un rôle dans l'étiologie de l'obésité. Or, la leptine est également synthétisée au niveau des glandes salivaires et participerait aux processus gustatifs ; elle intervient aussi au niveau des gonades dans les mécanismes de fertilité (De Matteis et al 2002 ; Bajari et al 2004).

- **La ghréline**, qui est synthétisée par le duodénum et l'estomac, va s'opposer à l'action de la leptine sur la prise alimentaire. A noter ici que l'estomac synthétise une autre hormone impliquée dans la prise alimentaire, la cholécystokinine (CCK), encore appelée hormone de la satiété. Tout comme la leptine, la ghréline est exprimée dans les gonades. Au niveau central, c'est un inhibiteur de la synthèse de LH (Barreiro & Tena-Sempere, 2004). Elle est également exprimée dans les glandes salivaires où elle interviendrait dans la protection de l'épithélium buccal via la salive (Groschl et al 2005).

Outre le fait de franchir la barrière hémato-encéphalique et d'exercer des effets différents sur ce système pour contrôler la prise alimentaire et la balance énergétique, ces hormones périphériques vont donc aussi participer de manière étroite au contrôle de la sécrétion de FSH et de LH par l'axe hypothalamo-hypophysaire et, en cascade, agir sur la production des hormones sexuelles. Inversement, leur production est modulée par les hormones sexuelles.

Il y a donc une relation étroite entre la régulation du métabolisme énergétique et les fonctions de reproduction.

2. Les hormones sexuelles stéroïdiennes

Les hormones sexuelles stéroïdiennes sont responsables du dimorphisme sexuel de nombreux organes incluant les glandes salivaires, la glande mammaire, le cerveau, mais aussi le foie et la peau.

2.1. Biosynthèse et métabolisme

Les trois familles d'hormones concernées par ce travail (androgènes, œstrogènes et progestagènes) constituent des signaux régulateurs cruciaux chez les Vertébrés. Tout comme les glucocorticoïdes, ces hormones sont des stéroïdes dérivant du cholestérol

(Figure 19). Le cholestérol est converti en prégnénolone, le précurseur de toutes les autres hormones stéroïdes (Garrett et Grisham, 2000).

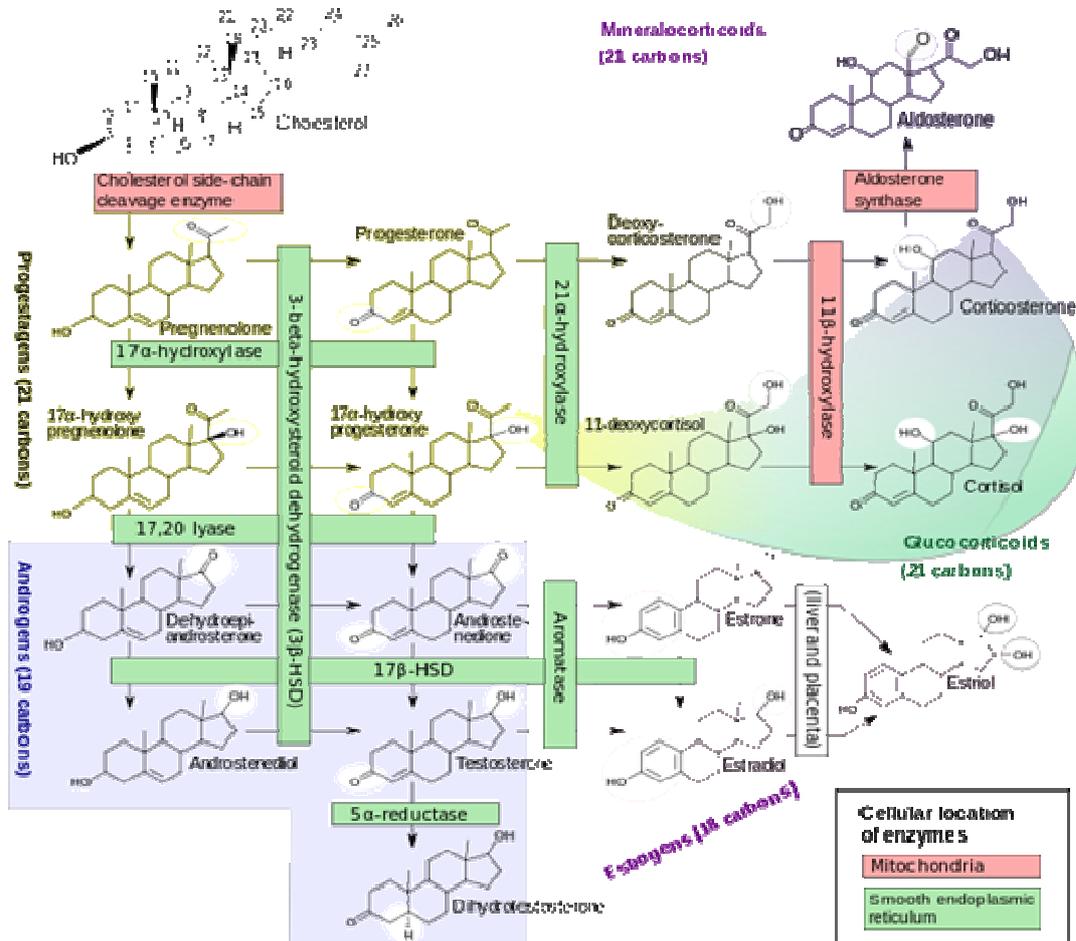


Figure 19 : Biosynthèse des hormones stéroïdes (Boron et Boulpaep, 2003).

2.1.1. Les hormones femelles

2.1.1.1. Les œstrogènes

Les œstrogènes sont des stéroïdes qui renferment 18 carbones (C18) et un noyau estrane (voir la figure 19). Par leur action sur la différenciation et la prolifération cellulaire, ils orientent le dimorphisme sexuel et la mise en place de l'appareil reproducteur dès les premiers stades de l'embryogenèse, stimulent le développement de la puberté et permettent le maintien des caractères sexuels féminins (organes génitaux, glandes mammaires) et participent au développement et au maintien de l'homéostasie corporelle. Ils sont sécrétés principalement par les ovaires dans les cellules de la thèque interne et de la granulosa du follicule ovarien.

Chez la femme, trois types d'hormones naturelles sont présentes: l'estrone (E1), le 17 β -œstradiol (E2) et l'estriol (E3). La transformation des androgènes en œstrogènes est réalisée préférentiellement par la conversion de l'androstènedione en E1 qui devient l'E2 (Ganong, 2005). Ce dernier constitue l'hormone naturelle la plus active sécrétée par la femme. Il permet le maintien de la fertilité et des caractères sexuels secondaires féminins (Tortora et Grabowski, 2001). L'E2 est en équilibre avec l'E1 et l'E3; ce dernier est la forme la moins active (Wilson et Foster, 1985) et peut être considéré comme un produit métabolique des autres œstrogènes.

L'E2 est formé pendant le cycle ovarien qui comporte deux phases, la phase folliculaire et la phase lutéale (Figure 20). Lors de la phase folliculaire, sa concentration plasmatique augmente jusqu'à atteindre un pic pré-ovulatoire. Par la suite, sa concentration diminue considérablement avant la libération de l'ovule. Une seconde augmentation d'E2 est observée en phase lutéale, lorsque le corps jaune se développe. La dégénérescence de celui-ci en corps blanc entraîne une diminution progressive des concentrations d'E2 et de progestérone. Cette diminution d'hormones ovariennes stimule la libération de GnRH, de FSH et de LH qui initient la maturation d'un nouveau follicule (Tortora et Grabowski, 2001). Après la fécondation de l'ovule, l'E3 sécrété majoritairement par le trophoblaste du placenta devient, au cours des mois, l'œstrogène le plus important. À la fin de la période de fertilité, l'E2 est remplacé par l'E1 qui devient alors le principal œstrogène, produit par la transformation des androgènes d'origine surrénalienne (Wilson et Foster, 1985).

Le catabolisme des œstrogènes est réalisé principalement dans le foie où ils sont convertis en glucuro-conjugués ou en sulfo-conjugués (Ganong, 2005). Une partie est excrétée dans les urines sous forme de glucuronides ou de sulfates, mais les œstrogènes naturels peuvent également être éliminés dans les fèces. Ces dernières contiennent de 5 à 10 % d'œstrogènes et la majorité de ceux-ci (85 à 90 %) y sont sous forme non métabolisée (D'Ascenzo et al., 2003).



Figure 20 : Cycle menstruel chez la femme

(<http://kids.britannica.com/comptons/art-172221/A-womans-menstrual-cycle-regulates-the-functions-of-the-ovaries>)

2.1.1.2. La progestérone

Ce stéroïde, qui comporte 21 carbones (C21) et un radical « prégnan » (voir la figure 19), est synthétisé dans les ovaires et dans le placenta. Sa concentration évolue aussi au cours du cycle menstruel, augmentant sensiblement après l'ovulation et chutant si aucune fécondation ne se produit. En plus d'assurer la régulation des cycles de la reproduction chez la femme, la progestérone maintient la grossesse et prépare les glandes mammaires pour la lactation (Tortora et Grabowski, 2001). Les surrénales et les testicules produisent aussi de faibles quantités de progestérone. Le catabolisme de la progestérone s'effectue essentiellement dans le foie où elle est transformée en prégnanediol. Ce composé est ensuite excrété dans l'urine sous forme de glucuro-conjugués (Ganong, 2005).

2.1.1.3. Les hormones de gestation

Au début de la gestation, le trophoblaste du placenta produit une hormone, l'HCG (Human Chorionic Gonadotropin) qui induit, comme la LH, un taux d'oestrogènes élevé et inhibe la GnRH, ce qui empêche toute autre ovulation. Peu à peu, le placenta produit

également des oestrogènes et de la progestérone qui maintiennent le placenta en turgescence et permettent aussi le développement de l'embryon.

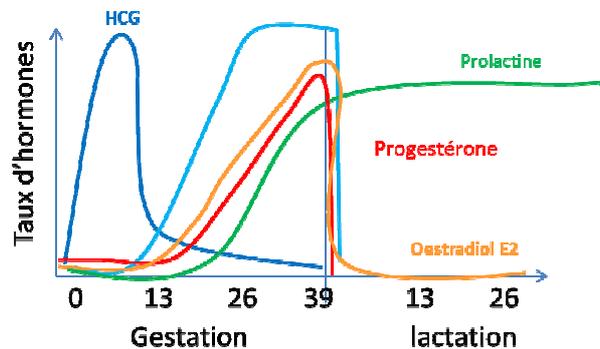


Figure 21 : Hormones sexuelles au cours de la gestation et à la naissance.

En fin de gestation, le chorion fabrique une nouvelle hormone peptidique, la HCS (Human Chorionic Somatotrophin) qui participe au contrôle de la glycémie de la mère et favorise la lipolyse à partir des réserves graisseuses de la mère. (Figure 21). A la naissance, le taux de progestérone chute brusquement, entraînant un pic d'ocytocine nécessaire aux contractions utérines, et la production de prolactine qui enclenche le processus d'allaitement et se maintient pendant toute la durée de la lactation.

2.1.2. Les hormones mâles

Les androgènes, hormones sexuelles masculines, sont des stéroïdes contenant 19 carbones (C19) et des dérivés de l'androstane (voir la figure 19). La testostérone est la principale hormone androgène. Bien qu'elle soit généralement produite par les testicules (dans les cellules de Leydig), de faibles quantités peuvent également être synthétisées par les glandes surrénales et les ovaires. La testostérone peut être convertie en dihydrotestostérone (DHT) dans certaines cellules cibles de la prostate et des vésicules séminales (Tortora et Grabowski, 2001).

La testostérone est aussi responsable du développement des conduits de l'appareil reproducteur et de la descente des testicules chez le fœtus, alors que la DHT entraîne la formation des organes génitaux externes. Lors de la puberté, ces hormones favorisent la croissance des organes reproducteurs et le développement des caractères sexuels secondaires masculins. Les androgènes jouent également un rôle important dans le comportement sexuel et la spermatogénèse. Par ailleurs, puisqu'il s'agit d'hormones anaboliques, elles stimulent la synthèse des protéines, ce qui augmente les masses musculaire et osseuse (Tortora et Grabowski, 2001).

Une fois son action terminée, la testostérone est inactivée surtout au niveau hépatique par différents mécanismes pour former des 17-cétostéroïdes qui sont éliminés dans l'urine. La majeure partie des 17-cétostéroïdes urinaires sont l'androstérone et son isomère, l'étiocholanolone (Ganong, 2005).

2.2. Mécanisme d'action

2.2.1. Voie génomique

Les hormones stéroïdiennes ont pour caractéristiques communes de réguler la transcription des gènes en se complexant avec un récepteur qui appartient à la classe des récepteurs nucléaires.

L'hormone pénètre dans le cytoplasme des cellules par diffusion passive, grâce à son caractère lipophile, et se lie à un récepteur cytosolique qui lui est spécifique et qui est généralement couplé à des HSP (Heat-shock protein) (Ylikomi et al., 1998). Ce complexe transite dans le noyau où il se dimérise. Le dimère démasque une séquence d'adressage nucléaire (HRE = Hormone Responsive Element) qui lui est propre, ce qui va déclencher sa transactivation ou à la répression du gène cible (Figure 22).

2.2.2. Voie non génomique

Les récepteurs aux hormones sexuelles sont aussi localisés sur la membrane plasmique : ils sont à l'origine d'effets non génomiques incluant l'implication de messagers secondaires caractéristiques de voies de signalisations cellulaires comme les MAP kinases ou des eNOS (endothelial nitric oxide synthase) (Furukawa et Kurokawa, 2007). Cette voie non génomique est une voie de réponse très rapide. Les mécanismes moléculaires de ces effets non génomiques directs sont de type biochimique, telle la phosphorylation de facteurs de croissance ou l'inhibition de tyrosine kinases. L'interaction compétitive ou non compétitive avec les sites catalytiques de divers complexes enzymatiques permet aux hormones d'exercer des effets cellulaires sur un grand nombre d'enzymes (notamment des enzymes du métabolisme des hormones stéroïdes) et des hormones thyroïdiennes mais aussi sur des facteurs de croissance (Watson et al., 2007).

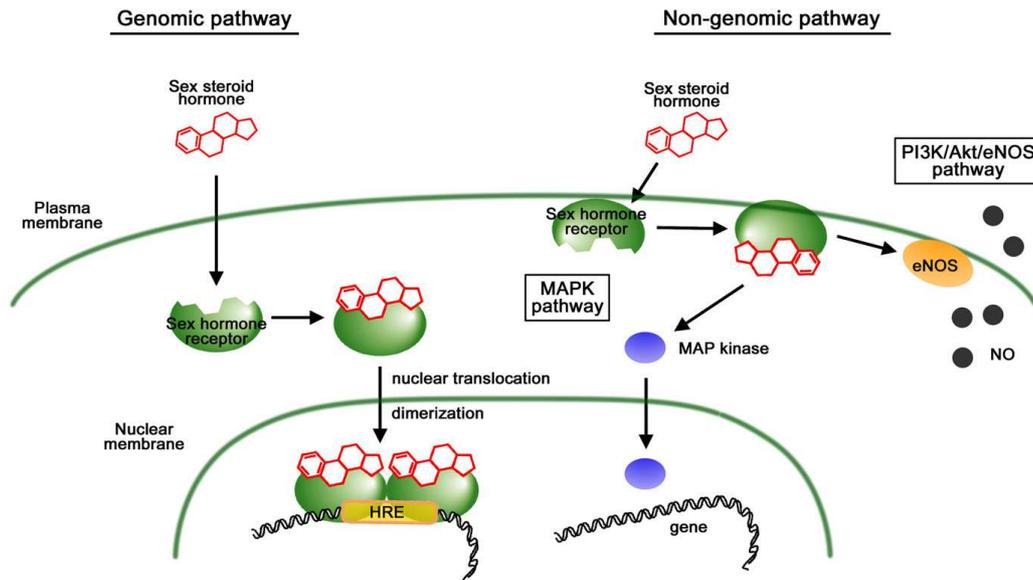


Figure 22 : Voie de signalisation génomique et non génomique des hormones stéroïdiennes (tiré de Furukawa et Kurokawa, 2007).

2.3. Les récepteurs nucléaires

D'une manière générale, les gènes des récepteurs des hormones sexuelles présentent des homologies de séquences et répondent à une nomenclature bien définie qui considère différentes régions, notées de A à F, ayant des fonctions précises et dont la présence caractérise l'isoforme :

- AF-1 (anciennement notée A/B) , AF-2 et AF-3 sont des zones de transduction indépendante du signal,
- DBD (ou DNA Binding Domain encore baptisée C) qui correspond à la zone de fixation de l'ADN et dimérisation,
- H (parfois aussi baptisée D) qui est une région charnière,
- LBD (Ligand Binding Domain) zone de fixation du ligand, impliquée dans la transactivation ou la répression du gène et qui dépend du ligand.

Les récepteurs aux oestrogènes diffèrent par leur structure dans la région LBD et par les régions AF (Figure 23).

2.3.1. Les récepteurs des œstrogènes (ER)

Au moins deux sous-types de récepteurs aux oestrogènes ont été identifiés chez les mammifères : l'ER α et l'ER β (Figure 17) (Green et al., 1986, Kuiper et al., 1996, Mosselman et al., 1996) ; un troisième, ER γ , a été décrit chez les poissons (Drummond et al., 2002).

L'ER α et l'ER β stimulent le plus souvent la transcription des mêmes gènes, mais chaque ER détient une spécificité de ligand (Enmark et Gustafsson, 1998 ; Pfaffl et al., 2001). Les différents œstrogènes et les xéno-hormones seront préférentiellement reconnus par l'un ou l'autre des récepteurs. Ainsi, le ER α possède une affinité pour l'œstradiol plus grande que le ER β . A l'inverse, les phytoestrogènes comme la génistéine sont de meilleurs ligands du ER β alors que l'estrone se fixe plutôt sur l'ER α (Dahlman-Wright et al., 2006).

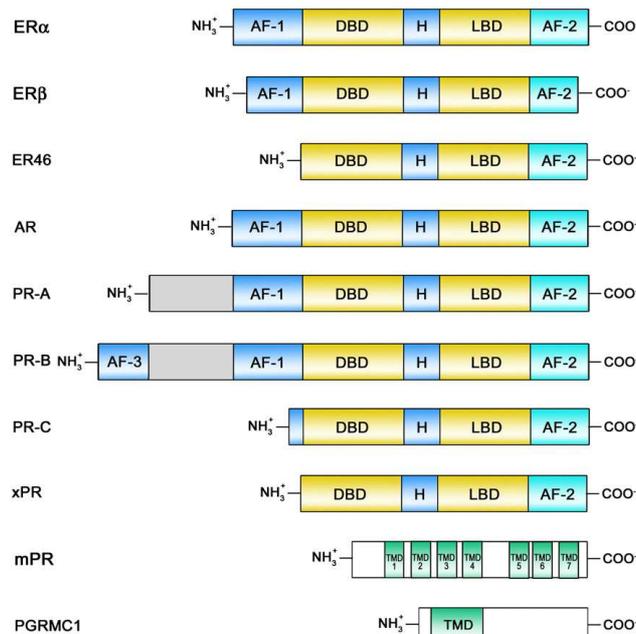


Figure 23: Comparaison des structures des gènes des récepteurs aux œstrogènes, aux androgènes et à la progestérone. (d'après Furukawa et Kurokawa, 2007)

L'ER α et l'ER β se trouvent exprimés dans une large variété d'organes tels que l'utérus, le vagin, les ovaires, les seins, les testicules, la prostate mais aussi dans des organes qui ne sont pas impliqués dans la reproduction tels que le foie, l'os, le cerveau, le système nerveux, les glandes salivaires. Toutefois, ils s'y expriment à des niveaux différents (Figure 24). Par exemple on retrouve une expression prédominante de ER β dans la vessie, la prostate, les poumons, l'os, l'intestin, les glandes salivaires et de ER α dans les organes génitaux, le tissu adipeux, la glande mammaire, le foie (Dahlman-Wright et al., 2006).

Les récepteurs des œstrogènes ont été localisés au niveau des glandes salivaires humaines, pour la première fois, par Dimery et al (1987) en utilisant des techniques de liaison au ligand (Dimery et al., 1987). Par immunohistochimie, deux études ont retrouvé un faible marquage des glandes salivaires aux ERs (Shick et al., 1995 ; Leimola-Virtanen et al., 2000), mais ces deux études ont utilisé le ER-ICA, anticorps qui reconnaît uniquement le ER α . Une étude plus récente menée chez l'Homme, a confirmé par immunohistochimie l'existence d'une faible quantité d'ER α au niveau des acini et des canaux, mais a montré la

présence d'ER β au niveau des glandes submandibulaires, parotides et des glandes salivaires mineures chez l'homme comme chez la femme (Saji et al., 2000). Elles peuvent donc être des cibles potentielles pour les xéno-hormones.

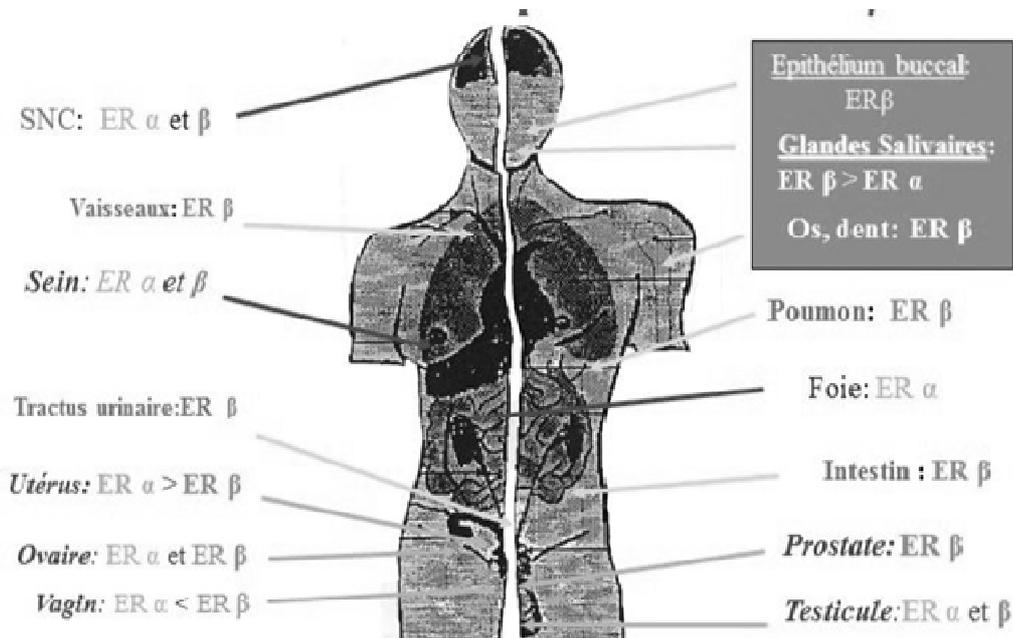


Figure 24: Organes exprimant les récepteurs des œstrogènes.

Dans la mesure où celles-ci ne présentent pas forcément la même affinité pour l'un ou l'autre de ces récepteurs d'une part, et que la répartition de chacun de ces récepteurs varie selon les organes et les tissus, on conçoit aisément qu'une même exposition puisse engendrer des effets différents selon la cible biologique, mais aussi la dose d'exposition. C'est sur cette différence de répartition et cette différence d'affinité pour divers substrats que repose la spécificité de certains phytoestrogènes et anti-œstrogènes (SERM) de synthèse utilisés comme substituts des œstrogènes (Basly & Lavier, 2005).

2.3.2. Les récepteurs de la progestérone

Chez l'homme, il existe deux isoformes du récepteur de la progestérone le PR A et le PR B. Le PR B a un rôle activateur des gènes cibles alors que le PR A serait plutôt inhibiteur. Les œstrogènes ont la capacité d'induire l'expression du PR dans plusieurs tissus et l'augmentation de cette expression est un bon marqueur de stimulation œstrogénique. Son rôle reste étroitement lié à celui des récepteurs des œstrogènes.

Chez l'Homme, le PR a été détecté au niveau de l'utérus, des ovaires, du sein, des testicules, du vagin, mais également au niveau du cerveau. Sa présence dans les glandes salivaires n'est pas bien étudiée, mais Ozono et al (1992) et Shick et al (1995) ont montré par immunohistochimie la présence occasionnelle du PR au niveau des acini et de certaines

cellules épithéliales. Le PR est exprimé aussi par quelques tumeurs des glandes salivaires humaines (Tarakji et Kujan, 2012).

2.3.3. Les récepteurs des androgènes

La structure de ce récepteur est très proche de celle du récepteur de la progestérone. Il existe deux isoformes de l'AR, l'AR A et l'AR B. Les AR A et B diffèrent par la longueur de leur séquence amino-terminale (McPhaul et Young, 2001). L'AR s'associe aux protéines chaperonnes HSP90 et 70. La fixation d'un agoniste provoque la dissociation du complexe, et un changement conformationnel du AR, qui se dimérise puis se fixe aux éléments de réponse de l'ADN nucléaire qui régulent l'expression de gènes spécifiques. Ses ligands endogènes sont la testostérone et son métabolite, la 5 α -dihydroxytestostérone (5 α -DHT), ainsi que l'androstènedione et la dihydroépiandrostérone (DHEA).

L'AR est principalement exprimé au niveau des testicules, de la prostate, des glandes surrénales, des reins, du cerveau, et de l'hypophyse (Ikeuchi et al., 2001). Le récepteur des androgènes s'exprime aussi de façon importante au niveau des glandes salivaires. Il a été mis en évidence pour la première fois par immunohistochimie au niveau des glandes parotides, submandibulaires et salivaires mineures dans les deux sexes, dans les noyaux de toutes les cellules des acini et des canaux (Laine et al., 1993).

2.4. Effets pléiotropes des hormones sexuelles

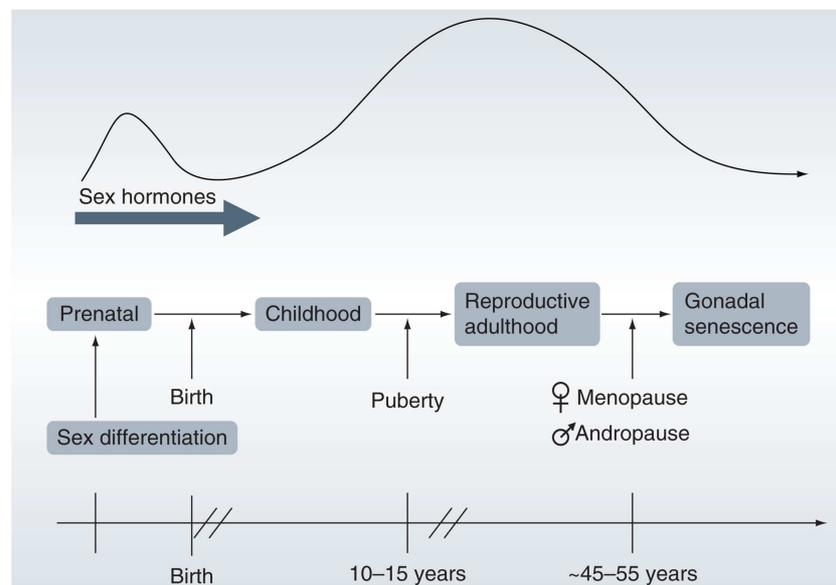
Ainsi, comme nous l'avons relevé plusieurs fois dans cette analyse bibliographique, les hormones sexuelles, via leurs effets pléiotropiques, les oestrogènes et les androgènes contrôlent la morphogénèse (Winter et al., 1977), le développement et la plasticité de nombreux tissus et organes tels que le tissu osseux (Raisz et Bingham, 1972), la peau (MacGregor, 1951), le muscle (Cheek, 1971), le cerveau (Harris, 1964) et aussi les glandes salivaires (chapitre 1).

Les hormones sexuelles jouent aussi un rôle très important dans le comportement. Il existe en effet un dimorphisme sexuel en ce qui concerne le comportement parental et social (De Vries et Villalba, 1997) ; plusieurs auteurs montrent que chez les mammifères, les hormones qui s'expriment en période prénatale et qui sont responsables de la différenciation sexuelle du corps, sont aussi impliquées dans la différenciation comportementale (Becker et al., 2002 ; Breedlove, 1992 ; Goy et McEwen, 1980). Le comportement alimentaire est aussi sous l'influence des hormones stéroïdiennes puisqu'il existe un dimorphisme sexuel ; les femelles par exemple consommeraient plus de sucré que les mâles (Kaplan et al., 1992). De plus, une ovariectomie chez les rates augmente la consommation alimentaire et le poids

corporel et ses effets sont réversibles si on restaure le taux physiologique d'œstradiol à sa valeur normale (Butera, 2010).

Par ailleurs, il faut garder à l'esprit la possibilité dont dispose la plupart des tissus à convertir les androgènes en oestrogènes, notamment le cerveau et le tissu osseux, ce qui amène à ne pas négliger l'impact des oestrogènes sur les tissus mâles. Inversement, les androgènes étant précurseurs des oestrogènes, ils prennent également une part active dans le développement des femelles. Ainsi, c'est l'équilibre œstrogène/androgène qui, à la puberté, permettra le développement harmonieux des caractères sexuels secondaires (organes génitaux, glandes mammaires, système pileux), du squelette, de la masse maigre et de la masse grasse. De concert avec les hormones du métabolisme énergétique, gène et androgène vont gouverner l'homéostasie corporelle via une action sur les métabolites sériques, la résorption de sel, la rétention de sodium dans le sang, augmentent la préférence au salé (Curtis et al., 2004) et leur participation au contrôle de la prise alimentaire. Au niveau cognitif, les œstrogènes interviennent dans le maintien des facultés intellectuelles et dans la mémoire (Sherwin et al., 1994).

De par la répartition des récepteurs hormonaux et la pluralité des mécanismes non génomiques qui ne seront pas détaillés dans ce mémoire, les hormones sexuelles agissent sur de nombreux organes, et leurs effets varient au cours de la vie, en accord avec les taux circulants.



**Figure 25 : Changements relatifs des hormones sexuelles au cours de la vie
(Turtzo et Mc Cullough 2010)**

Comme le résume la figure 25, les hormones sexuelles sont présentes dans l'organisme dès la période prénatale, d'une part pour maintenir la gestation, et également pour assurer la différenciation sexuée. Par leur action sur la différenciation et la prolifération cellulaire, les oestrogènes et les androgènes orientent le dimorphisme sexuel et la mise en place de l'appareil reproducteur dès les premiers stades de l'embryogenèse.

Pendant la première moitié du cycle et au cours de la gestation, ces hormones assurent également la prolifération de la muqueuse utérine. De plus, elles favorisent la fabrication de protéines dont le rôle est primordial pour la fabrication des muscles, des os, du collagène, de la peau... Mais leur principal rôle est d'assurer le phénotypage du sexe. En effet, si la détermination du sexe repose sur une répartition chromosomique (on naît XX ou XY), la mise en place des organes reproducteurs et du dimorphisme sexuel repose sur l'équilibre entre œstrogènes et androgènes au cours de la gestation, chacun agissant sur des récepteurs spécifiques.

3. Perturbateurs endocriniens ou Xeno-hormones

3.1. Définitions

L'expression « perturbateur endocrinien » reste le terme le plus utilisé bien qu'il existe plusieurs synonymes pour décrire les molécules exogènes ayant des propriétés hormonales. En 1996 lors de l'atelier Européen de Weybridge sur les effets des perturbateurs endocriniens sur la santé humaine et animale a été proposée une définition qui fait la distinction entre un perturbateur endocrinien, et un perturbateur endocrinien potentiel (European Union Reports, 1996) :

« Un perturbateur endocrinien est une substance exogène provoquant des effets délétères sur la santé dans un organisme intact, ou sur sa descendance, suite à des modifications dans ses fonctions endocriniennes. Un perturbateur endocrinien potentiel est une substance possédant des propriétés qui pourraient éventuellement provoquer une perturbation endocrinienne dans un organisme intact. »

En 1997, un atelier de travail sponsorisé par l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (EPA) a établi la définition suivante, qui étend le principe de perturbation endocrinienne aux populations : « Un perturbateur endocrinien est une substance chimique ou un mélange qui, d'après les principes et les données scientifiques, le poids de l'évidence, et le principe de précaution, altère une ou plusieurs fonctions du système endocrinien et provoque des effets délétères au niveau de l'organisme, de sa descendance, des populations ou des sous-populations » . Une troisième définition précise les modes d'action des perturbateurs endocriniens, indiquant que ce sont « des substances

qui, interférant avec les fonctions du système hormonal, risquent d'influer négativement sur les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, d'action ou d'élimination des hormones » (UE 2002).

La perturbation endocrinienne n'est donc pas considérée comme un effet adverse en soit, mais comme un mode d'action pouvant mener à des changements fonctionnels et à des effets délétères au niveau de l'individu ou des populations.

En conclusion, toutes ces définitions permettent de considérer les PE comme des substances partageant un mécanisme d'action commun. Leurs structures chimiques comme leurs origines sont extrêmement variées. En effet plus de 500 substances perturbatrices endocriniennes ont été identifiées (Waller et al., 1996). On peut les classer par origine, par usage, par nature chimique...

Les perturbateurs endocriniens peuvent donc être d'origine naturelle (hormones). Les xéno-hormones naturelles sont présentes dans les organismes vivants (œstrogènes, progestérone, testostérone) mais aussi dans l'alimentation humaine et animale sous forme de phytoestrogènes (Verdeal et Ryan, 1979 ; Kalda et Hughes, 1989). Certains perturbateurs endocriniens sont des substances chimiques synthétiques utilisées dans l'industrie (phtalates, alkylphénols...) ou dans le secteur agricole (pesticides, hormones synthétiques) et leurs sous-produits comme la dioxine (Stillman, 1982 ; Arai et al., 1983 ; Swan et al., 2003). Dans le tableau III sont récapitulés les principaux perturbateurs endocriniens.

Tableau III : Principaux perturbateurs endocriniens hormis les hormones naturelles (Colborn et Clement, 1992 ; Colborn et al., 1993 ; Brevini et al., 2005).

HERBICIDES ET FONGICIDES		INSECTICIDES		
Fongicides	Vinclozoline	Organochlorés	DDT	
	Procymidione		DDE	
	Fénarimol		Méthoxychlore	
	Zirame		Lindane	
	Nitrofène		Dieldrine	
	Trifuraline		Heptachlore	
	Bénomyle		Endosulfan	
	Mancozèbe		Toxaphène	
	Manèbe		Mirex	
	Amitrole			
	Zinèbe		Organophosphorés	Parathion
	Tributylétain		Carbamates	Méthomyl
Herbicides	Atrazine		Carbaryl	
	Alachlore	Pyréthroïdes de synthèse	Cyperméthrine	
	Linuron	Carbinols	Dicofol	
PRODUITS CHIMIQUES INDUSTRIELS		PHYTOOESTROGENES		
Hexachlorobenzène		Génistéine		
Biphényles polychlorés (PCB) et Dioxines		Coumestrol		
Bisphénol A		Daidzéine		
Styrènes		Enterolactone		
Alkylphénols		Zéaralénone		
Phtalates				

3.2. Modes d'action

3.2.1. Interactions directes avec les récepteurs hormonaux

3.2.1.1. Action agoniste

Un perturbateur endocrinien « agoniste » est un composé chimique capable d'entrer en compétition avec une hormone endogène, de se fixer à son récepteur et de l'activer, provoquant les effets normalement exercés par l'hormone endogène. On parle dans ce cas d'effet mimétique et le pouvoir d'un xénobiotique agoniste dépend à la fois de son affinité pour le récepteur et de sa capacité à induire une réponse. La plupart des xénobiotiques agonistes provoquent des réponses plus faibles que les hormones endogènes même s'il existe des contre-exemples comme le cas du 17 α -éthynylœstradiol (Lister et Van der Kraak, 2001). On notera enfin que la plupart des xénohormones (bisphénol A, alkylphénols,

phytoestrogènes...) agissent de manière agoniste sur les récepteurs des oestrogènes (Lintelmann et al., 2003).

3.2.1.2. Action antagoniste

Des PE agissent sur les récepteurs hormonaux selon un mode antagoniste : ils peuvent se lier à un récepteur donné, et bloquer ou diminuer la réponse induite par une hormone endogène. Cette inhibition peut être compétitive dans le cas où l'agoniste endogène (hormone) et l'antagoniste exogène sont en compétition pour le même site de liaison du récepteur, ou non compétitive dans le cas où l'inhibiteur se lie au récepteur ailleurs que sur le site d'activation.

Parmi les xénohormones antagonistes, on retrouve l'herbicide linuron, le fongicide vinclozoline et leurs métabolites (récepteurs des androgènes) ainsi que le tamoxifène (récepteurs des œstrogènes) (Lintelmann et al., 2003 ; Mueller, 2004).

3.2.2. Interactions indirectes avec le système endocrinien

3.2.2.1. Modification de la concentration en hormone

Une molécule exogène peut perturber indirectement les fonctions d'une hormone en influant sur sa concentration, via une modification de sa métabolisation, de son transport ou de sa libération depuis son lieu de stockage.

Par exemple le DDT et le DDE, les PBCs, certains fongicides, le lindane et plusieurs herbicides interfèrent dans la stéroïdogénèse (Whitehead et Rice, 2006).

Les phytoestrogènes ont été beaucoup plus étudiés que les autres xénohormones quant à leur interférence avec la stéroïdogénèse. Par exemple plus de 30 isoflavones ont un pouvoir d'inhibition sur la 3 β -HSD (Wong et Keung, 1999) et la génistéine peut réduire l'activité de la 17 β -HSD (Makela et al., 1995) amenant une réduction de la synthèse d'œstradiol.

Le *p,p'*-DDE peut augmenter l'activité de l'aromatase CYP19 (Younglai et al., 2004) dans les gamétocytes humains et il a également été rapporté que de fortes concentrations de *p,p'*-DDE inhibaient le CYP19 dans le foie, la prostate et le placenta (Allera et al., 2004). Le lindane peut lui aussi inhiber l'activité de l'aromatase alors que la vinclozoline peut l'induire (Sanderson et al., 2002). Par ailleurs, certains métabolites des PBCs, hydroxylés, et des HAP sont capables d'inhiber l'œstrogène sulfotransférase (Kester, 2002), enzyme qui inactive les œstrogènes et permet leur excrétion. Ceci entraîne une augmentation de la concentration circulante des œstrogènes.

3.2.2.2. Modification de la concentration en récepteurs

La concentration en récepteurs d'une hormone peut être modifiée par certains PE. C'est par exemple le cas de la 2, 3, 7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) qui agit comme agoniste exogène pour l'AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor), dont l'activation induit une augmentation de l'expression des enzymes responsables de la dégradation du récepteur aux œstrogènes (Safe et Krishnan, 1995). Cet effet se cumule d'ailleurs avec une augmentation de l'expression des enzymes du métabolisme de l'E2 et une inhibition de l'expression des gènes contrôlés par cette même hormone.

3.3. Constats de perturbation endocrinienne

3.3.1. Constats au niveau de la faune

Les premiers constats des effets potentiels des PE sur le fonctionnement du système endocrinien sont liés à des observations faites dans le milieu naturel. En effet, des anomalies sur les organes reproducteurs, voire une diminution des populations, ont été observées chez les animaux sauvages dans les années 1980. Ces constatations seraient la conséquence d'un effet oestrogénique probablement déclenché par les PE présents dans l'environnement. Dès lors, un lien causal a pu être mis en évidence entre l'exposition aux PE et les anomalies sur le développement ou la reproduction de différentes populations d'animaux sauvages.

On peut citer comme exemples connus :

- *La masculinisation des femelles* de certaines espèces de gastéropodes marins due au tributylétain (TBT). Cette substance toxique pour les algues entraine dans la composition de peintures anti-salissures appliquées sur la coque des bateaux. Mais cette molécule s'avère être également extrêmement active sur les mollusques marins qui mangent les algues. Le bigorneau perceur y est particulièrement sensible. Ainsi, le développement d'un pénis chez les individus femelles a été responsable du déclin de populations locales dans le monde entier (Folsvik et al., 1999). D'autre part, des populations entières de bulots ont disparu en mer du Nord à cause du TBT, avec des anomalies entraînant généralement une fertilité fortement réduite (Gooding et al., 2003).

- *Le cas du micro-pénis* chez les alligators, observé dans les années 1980 en Floride, a été largement décrit dans la littérature. Guillette et al ont montré que les anomalies du développement et du fonctionnement de l'organe sexuel sont associées à un déversement massif de pesticides tels que le DDT, dans le lac d'Apopka en Floride aux États-Unis. La population d'alligators présente dans ce lac a diminué de façon importante en quelques

années, accompagnée d'un déclin du taux d'éclosion d'œufs entre 1983 et 1988 (Guillette et al., 1994 ; 1996).

– D'autres études ont également mis en évidence une augmentation excessive du taux de grenouilles anormales en Amérique du Nord. Les malformations des membres sont prédominantes ainsi que des anomalies du système nerveux central et des yeux (Meteyer et al., 2002 ; Schoff et al., 2003).

- Les poissons vivant à proximité de certaines sources de contamination et dans les zones les plus contaminées, l'exposition à des déversements d'effluents industriels ou urbains entraîne des effets sur leurs organes reproducteurs (Liney et al., 2006). Le phénomène d'hermaphrodisme semble également plus fréquent dans cette population (Hemming et al., 2001).

3.3.2. Constats chez l'homme

Le diethylstilbestrol (DES), reste l'un des seuls cas clairement établi de perturbation endocrinienne chez l'Homme. Le DES est un médicament prescrit dans les années 1950-1960 pour éviter l'avortement spontané. Cette molécule découverte en 1938 a montré une activité oestrogénique bien plus importante que toutes celles synthétisées auparavant. Ce n'est qu'au début des années 1970 que le monde scientifique et médical a réussi à faire le lien entre le DES et une série d'anomalies du tractus génital (Hunter et al., 1993 ; McLachlan et al., 2006). Ainsi, les filles exposées *in utero* ont développé des anomalies du vagin ou de l'utérus, et des formes inhabituelles de cancer de l'utérus au moment de la puberté. Des études épidémiologiques ont également pu démontrer une augmentation du risque de développement d'hypospadias, de cryptorchidies, de kystes épидидymaires et d'inflammation testiculaire, ainsi qu'une baisse de la quantité et de la qualité de sperme chez les fils de femmes traitées au DES pendant leur grossesse (Martin et al., 2008).

L'exposition des sujets humains à des substances toxiques pour observer les effets nocifs qui pourraient en résulter est impossible pour raison éthique. De ce fait, la majeure partie des données empiriques qui établissent un lien entre des PE et des effets délétères sur la santé, proviennent d'études sur des populations humaines qui ont été accidentellement exposées à des substances toxiques, ou sur des petits groupes de population qui sont exposés à cause de leur travail ou de leur régime alimentaire. On peut citer comme exemple :

- L'accident de Seveso en 1976, en Italie, lors duquel de grandes quantités de dioxines ont été déversées dans l'environnement, s'est traduit quelques années

plus tard par une hausse de l'incidence d'hypospadias chez les enfants dont les parents avaient été exposés (Mastroiacovo et al., 1988).

- Une augmentation de la fréquence des anomalies génitales (cryptorchidie et hypospadias) a été rapportée chez les Norvégiens nés dans des fermes où des pesticides avaient été utilisés (Kristensen et al., 1997), ainsi que dans des zones d'utilisation intensive de pesticides (zones agricoles) en Espagne (Garcia-Rodriguez et al., 1996).
- Un syndrome associant des troubles neurologiques et une infertilité a été observé vers les années 1970 chez des ouvriers fabriquant des pesticides, comme le chlordécone (Képone) (Hammond et al., 1979).

3.4. Evaluation du risque pour l'homme

3.4.1. Nouveau dogme toxicologique (effets en U)

L'approche de l'évaluation du risque repose sur le concept qu'il existe pour toute molécule une dose seuil à partir de laquelle commencent à se manifester des effets toxiques qui deviennent de plus en plus sévères, en fonction de l'augmentation de la dose et de la durée d'administration. En dessous de ce seuil, aucun effet adverse ou toxicologique n'est décelable. L'évaluation du risque est donc dépendante de la caractérisation des effets indésirables, observés dans des études de toxicité, sur des animaux de laboratoire, de telle façon que les doses sans effet, les NO(A)ELs « No Observed (Adverse) Effect Levels » ou en français « Dose Sans Effet Nocif Observé », et les « Lowest Observed (Adverse) Effect Levels » (LO(A)ELs) ou en français « Dose Minimale avec Effet Nocif Observé » puissent être identifiés. En particulier, le terme NOAEL est utilisé dans le domaine des faibles doses et est défini comme la dose la plus élevée pour laquelle on n'observe pas d'augmentation statistiquement (ou biologiquement) significative en fréquence ou en sévérité d'un effet néfaste, dans un groupe exposé à la substance par rapport à un groupe non exposé. Cette dose est généralement spécifique d'une espèce, d'un effet et d'une voie d'administration. Lorsque plusieurs NOAELs ont été déterminés (plusieurs études avec espèces différentes ou voies différentes), la dose la plus basse est retenue (EPA, 2010). A l'inverse, la LOAEL est la dose la plus faible à laquelle on observe une augmentation statistiquement ou biologiquement significative dans la fréquence d'effets néfastes sur le développement par rapport au groupe contrôle. (Figure 26).

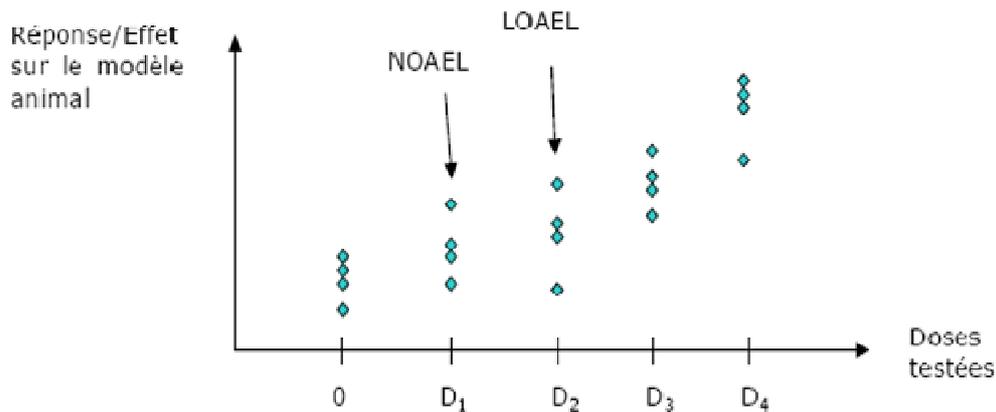


Figure 26 : Relation dose-réponse (Rapport AFSSET, 2006)

Donc en toxicologie, l'existence d'une dose seuil en dessous de laquelle aucun effet adverse n'est constaté est admise. Toutefois, des effets avérés de perturbateurs endocriniens à des doses bien inférieures à celles traditionnellement étudiées par les toxicologues ont été rapportés dans la littérature, et font actuellement l'objet de controverses. La polémique qui en résulte, défie potentiellement le principe intangible de la Toxicologie selon lequel c'est "la dose [qui] fait le poison".

De plus, progressivement le dogme de l'effet-dose linéaire a été remis en question. Plusieurs auteurs ont montré des effets à des doses égales ou très inférieures à la dose journalière admise, notamment celle de Murray et al (2007) qui ont révélé des lésions précancéreuses au niveau de la glande mammaire suite à une exposition à de très faibles doses de Bisphénol A.

Ainsi, il a été décrit le mécanisme de dose-effet non linéaires avec des effets pouvant être plus forts à faible dose qu'à forte dose (Figure 27).

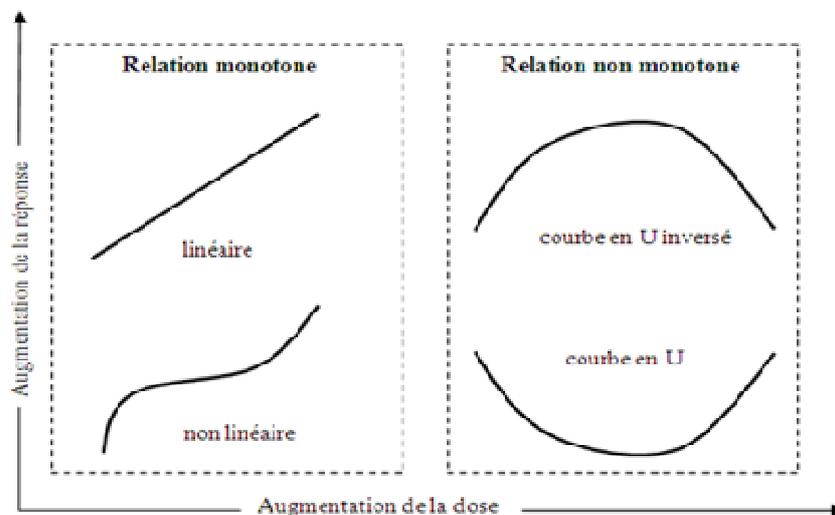


Figure 27 : Les différentes relations dose effets

3.4.2. Effet des mélanges

L'approche traditionnelle en toxicologie et en écotoxicologie est d'étudier les effets d'une seule substance, indépendamment d'autres expositions. Or, les organismes sont exposés à de multiples substances, susceptibles d'agir en synergie. C'est ainsi que des substances, considérées indépendamment comme non toxiques, peuvent présenter des effets délétères si elles agissent conjointement. C'est ce qu'on appelle « l'effet cocktail ». Il a été admis pendant longtemps que les composés présents aux doses correspondant à leur « no observable adverse effect level » (NOAEL) et, qui agissent via des mécanismes d'action différents, ne pouvaient pas exercer d'effets même lorsqu'ils étaient présents en mélange. Cependant, certains perturbateurs endocriniens peuvent avoir des effets additifs ou synergiques quand ils sont présents ensemble. Il n'est, en effet, pas exclu que des mélanges de perturbateurs endocriniens se révèlent toxiques, alors que pris individuellement et aux mêmes doses, chacun des composés ne le serait pas (Hass et coll, 2007 ; Christiansen et coll, 2009 ; Kortenkamp, 2007).

A titre d'exemple l'étude de Silva et al (2002) (Figure 28) a testé l'effet de 8 composés oestrogéniques (8 perturbateurs endocriniens) par le test YES (Yeast Estrogen Screen) ou test d'oestrogénicité sur levures ; un test *in vitro* qui met en œuvre des cellules de levure génétiquement modifiées possédant un gène exprimant le récepteur humain aux œstrogènes couplée à une réaction colorimétrique. Les perturbateurs endocriniens vont se fixer sur les récepteurs oestrogéniques et par une suite de réactions enzymatiques, les levures vont produire la β -galactosidase qui transforme la couleur jaune de départ du mélange en couleur rose qui absorbe à 540 nm en spectroscopie (Murk et al., 2002). Les résultats montrent que l'effet de chacun des composés pris séparément est pratiquement nul ("barres" 1 à 8) et si l'on fait, par calcul, la somme de ces effets, on arrive à un effet, là encore, très faible (barre "ES" sur le graphique, figure 21). Par contre, si ces composés sont mélangés, l'effet de l'ensemble est beaucoup plus fort (barre "mix" sur le graphique, figure...). En mélange, on a donc parfois un effet "1+1=3". En mélange, on observe parfois un effet "1+1=3".

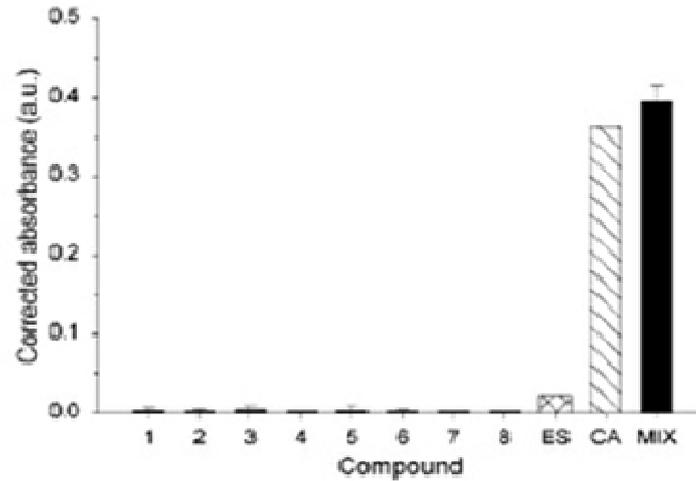


Figure 28 : Effets de composés oestrogéniques (perturbateurs endocriniens) mesurés

par le test YES (Silva et al., 2002). 1 à 8 : effets des composés testés individuellement

ES : somme arithmétique des effets individuels mesurés des 8 composés

CA : modèle de prédiction « addition des concentrations » l'effet qu'on s'attend à avoir

MIX : effets mesurés des composés testés en mélange

3.5. La Génistéine et autres phytoestrogènes

Certaines plantes produisent naturellement les phytoestrogènes qui sont des substances présentant des propriétés oestrogéniques. La plupart des phytoestrogènes appartiennent au groupe des flavonoïdes (Tableau VI), parmi lesquels se distinguent trois classes : les isoflavones, les coumestans et les flavonoïdes prénylés. Un autre groupe de phytoestrogènes rassemble des molécules non flavonoïdes.

Tableau IV : Classification structurale des phytoestrogènes

Isoflavonoïdes			Non flavonoïdes
Isoflavones	Coumestanes	Prénylflavonoïdes	Lignanes
Génistéine	Coumestrol	8-prénylnaringénine	Laricirésinol
Daidzéine			Isolaricirésinol
Glycitéine		6-prénylnaringénine	Matairésinol
Biochanine A		Xanthohumol	Sécoisolaricirésinol
Formononetine		Isoxanthohumol	(Entérodol) (Entérolactone)

L'activité oestrogénique des phytoestrogènes peut s'expliquer en raison des analogies structurales qu'ils partagent avec l'œstradiol (Figure 29)

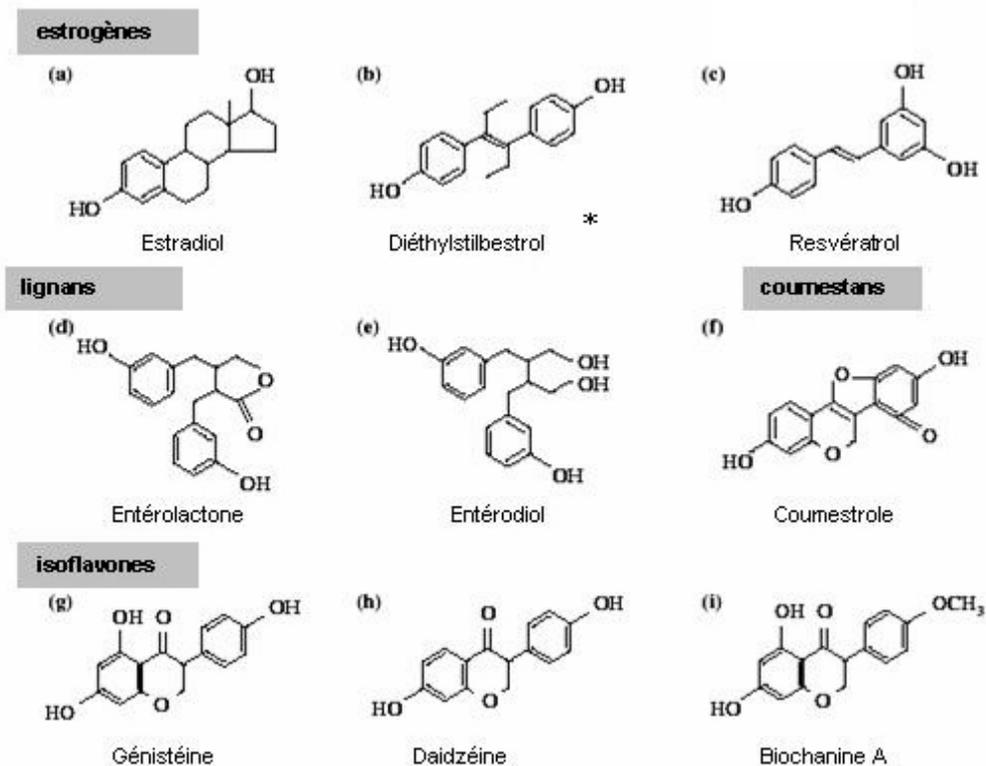


Figure 29 : Structures chimiques de quelques phytoestrogènes comparées à celle de l'œstradiol.

3.5.1. Voies d'exposition et métabolisme

L'homme est exposé aux phytoestrogènes, entre autres la génistéine, via la consommation de plantes comme le soja et de leurs produits de transformation. Le soja est la source principale en phytoestrogènes, et particulièrement en génistéine (Mazur et Adlercreutz, 1998). On retrouve les isoflavones, dont la génistéine, dans les laits infantiles à base de soja (18 – 41 mg d'isoflavones par litre, rapport AFSSA, 2005). La consommation d'isoflavones chez les nourrissons âgés de 4 mois nourris avec ces laits maternisés serait de 4,5 à 8 mg/kg/pc/j (Setchell et al., 1998). Le lait provenant du sein maternel peut également contenir des isoflavones, en fonction du régime alimentaire de la mère et exposer les nourrissons à des quantités variables de phytoestrogènes. Ainsi, des concentrations allant de $5,1 \pm 2,2$ à $70,7 \pm 19,2$ nM voire 200 nM d'isoflavones ont été retrouvées dans les laits de mères consommant de la nourriture à base de protéines de soja (Francke et al., 1998 et 2006). En ce qui concerne les personnes suivant un régime végétarien, l'ingestion journalière de génistéine, serait en moyenne de 0,1 mg/kg/pc/j (Clarke et al., 2003), tandis qu'un régime normal apporterait moins d'1 mg d'isoflavones totales par personne (Wiseman et al., 2002). Chez les populations asiatiques, la consommation estimée d'isoflavones, dont la génistéine, est de 25 à 40 mg/j en moyenne et peut atteindre 100 mg/j mais avec une variation très importante entre les communautés, Cette quantité est bien plus élevée qu'en Europe ou aux USA, du fait de l'utilisation habituelle du soja comme ingrédient dans les régimes traditionnels.

Enfin, il existe sur le marché des suppléments alimentaires riches en isoflavones pour le traitement de symptômes post-ménopausaux ou pour développer chez la femme la taille de la poitrine. Leurs contenus en phytoestrogènes sont extrêmement variables, cependant la prise quotidienne moyenne est estimée entre 30 et 70 mg d'isoflavones (Manach et al., 2004).

La génistéine comme les autres isoflavones se trouve sous forme glycosidique, sous forme de génistine pour la génistéine. Le métabolisme des isoflavones est réalisé au niveau de l'intestin et du foie. Tout d'abord, pour être absorbée, la génistine doit être hydrolysée et libérée de son sucre par la flore bactérienne et transformée ainsi en génistéine (Setchell et al., 2002) qui peut passer la barrière intestinale et circuler dans le sang. Une fraction de la génistéine peut également migrer vers le foie pour y être conjuguée à l'acide glucuronique et/ou sulfatée (Setchell, 1998 ; Safakianos et al., 1997). Le métabolisme des isoflavones de soja est repris dans la figure 30.



Figure 30 : Métabolisme des isoflavones de Soja (<http://www.natesis.com>)

La génistéine circule dans le plasma principalement sous forme conjuguée à l'acide glucuronique (Holder et al., 1999). Chez l'homme la génistéine a été retrouvée dans plusieurs fluides biologiques : le plasma, la salive, les fèces, l'urine, la bile, le lait maternel (Adlercreutz et al., 1995). Par exemple pour une consommation unique de 16 mg/kg/pc de génistéine, la concentration de la génistéine non modifiée retrouvée dans le sang est de 0,07 μM , alors qu'elle est de 7,7 μM pour la génistéine et ses conjugués (Busby et al., 2002). On retrouve aussi la génistéine et ses métabolites dans le lait maternel (Franke et al., 1998). Doerge et al (2001) ont montré que la génistéine et ses métabolites sont retrouvés dans le plasma et le cerveau de fœtus exposés *in utero* aux doses de 20, 34 ou 75 mg/kg/pc

3.5.2. Propriétés œstrogénique

La génistéine présente une affinité pour les deux sous-types d'ER. Cependant son affinité pour l'ER β est plus prononcée que pour l'ER α (approximativement 30 fois plus importante) (Pike et al., 1999) et son activité est estimée mille fois plus faible que l'œstradiol (Berinholt et Larsen ; Wang et Kurzer, 1997). Son action peut être œstrogénique à faibles concentrations et anti-œstrogénique à fortes concentrations (Messina et al., 2006). Mais la réponse anti-œstrogénique dépendant aussi de la concentration en œstradiol dans le milieu de culture pour une faible concentration d'œstradiol (10^{-11}M) comme chez la femme ménopausée, la génistéine est agoniste alors que pour une concentration plus forte (10^{-9}M) comme en situation pré-ménopause elle inhibe l'action de l'œstradiol (Hwang et al., 2006).

In vivo le test utéro-trophique (consiste à mesurer l'augmentation du poids de l'utérus) constitue un excellent moyen pour mesurer l'activité oestrogénique d'une substance donnée. Selon ce test, chez la souris, la génistéine serait 100 000 fois plus puissante que le DES (Song et al., 1999). Chez des rates prépubères, l'exposition à la génistéine à une dose de 500 mg/kg/pc/j induit une augmentation du poids de l'utérus et une hypertrophie de l'épithélium utérin (Cotroneo et Lamartiniere, 2001). De même, expérimentalement, l'activité oestrogénique des phytoestrogènes chez les animaux immatures se traduit par une utéro-trophie, une ouverture vaginale précoce et une cornification vaginale (Kurzer et Xu, 1997 ; Gradolatto, 2004).

3.5.3. Effets physiologiques

3.5.3.1. Effets sur les troubles liés à la ménopause

L'effet des phytoestrogènes sur les symptômes de la ménopause, comme les bouffées de chaleur, est controversé dans la littérature ; A titre d'exemple, la prise journalière de 70mg d'isoflavones (génistéine + daïdzéine) pendant 16 semaines par des patientes (n=75) réduirait la fréquence des bouffées de chaleur de 61 % alors que le placebo ne réduit que de 21 % les bouffées (Faure et al., 2002). Cependant une autre étude regroupant 87 patientes ayant reçu 42 mg d'isoflavones pendant 16 semaines a montré qu'il n'y avait aucun effet des isoflavones sur les symptômes de la ménopause (Lewis et al., 2006). Une étude plus récente utilisant la génistéine seule à la dose de 30mg/j sur 42 femmes en ménopause montre une réduction significative des bouffées de chaleur chez ces femmes suggérant un effet isolé de la génistéine pure. Par contre les effets des isoflavones dans la prévention de l'ostéoporose présentent des résultats intéressants aussi bien dans des modèles expérimentaux (Ishimie et al., 2000 ; Mathey et al., 2004; Byun et al., 2010) que dans des cas cliniques (Duncan et al., 2003 ; Wu et al., 2007 ; Wei et al., 2012).

3.5.3.2. Effets sur la fertilité et la reproduction

Les premières observations des effets délétères de composés végétaux sur le développement et la fertilité ont été faites chez des brebis ayant consommé de grandes quantités de trèfle (« syndrome du trèfle »), et chez lesquelles ont été mesurées des concentrations plasmatiques importantes en hormones endogènes accompagnées d'une perte de fertilité (Moersh et al., 1967). De nombreuses études complémentaires ont été menées chez les rongeurs afin d'évaluer le risque lié à une forte consommation en phytoestrogènes, telle la génistéine, sur la fertilité humaine.

Plusieurs études ont décrit les effets sur la reproduction des femelles. Ainsi, l'exposition pendant la période de gestation et de lactation à la dose de 0,2 mg de génistéine/kg/pc/j via la nourriture a provoqué un œstrus irrégulier, une diminution du poids de l'utérus et des ovaires des nouveaux-nés femelles (Awoiyi et al., 1998). Par ailleurs, une dose plus élevée (40 mg/kg/pc/j) de génistéine administrée du 1^{er} jour de la naissance jusqu'au 21^{ème} jour par gavage provoque un avancement de l'ouverture vaginale (Lewi et al., 2003). Dans le même sens, une dose de 10 mg/kg/pc/j donnée en injection sous-cutanée, avance l'ouverture vaginale de souris (Nikaido et al., 2005). L'altération de la fertilité des femelles a été aussi décrite dans plusieurs modèles de souris exposées aux isoflavones (Jefferson et al., 2005 ;2006 ;2009).

Chez les rats mâles l'injection sous-cutanée de 4mg de génistéine/kg/pc réalisée pendant 48 heures entre le 2^{ème} et le 18^{ème} jour après la naissance provoque une augmentation de l'apoptose des cellules germinales et une réduction du poids des testicules (Atanassova et al., 2002). Néanmoins, à une dose plus élevée de 100 mg de génistéine/kg de pc administrée par gavage on n'observe aucun effet sur les paramètres de fertilité des rats mâles exposés du 1^{er} jour de la naissance au 4^{ème} jour.

En résumé, les études menées chez les rongeurs ont montré que la génistéine avait des effets oestrogéniques sur les mâles et sur les femelles. Toutefois les effets les plus marqués sont obtenus Lorsque les expositions ont lieu à des périodes critiques du développement, c'est à dire *in utero*, en période néonatale et/ou pré-pubertaire.

3.5.3.3. Effets sur la cancérogenèse

La consommation de produits dérivés du soja ainsi que d'isoflavones, dès l'adolescence, dans des contextes alimentaires favorables, réduit le risque de cancer du sein et de l'endomètre de façon significative chez les femmes en Asie (Andres et al., 2011). Cet effet favorable retrouvé particulièrement chez les femmes asiatiques laisse supposer que les facteurs à prendre en considération dans l'effet protecteur des isoflavones de soja vis-à-vis du développement des cancers du sein sont : la durée d'exposition (souvent depuis l'enfance, *in utero*), la dose consommée par ces femmes (30 à 40 mg par jour d'isoflavones aglycones), et le rôle joué par la génétique et par certains nutriments comme les polyphénols, les acides gras appartenant à la famille des oméga 3 ... (Cassidy et al., 2006 ; Gerber et al., 2005). La consommation d'isoflavones même aussi importante quantitativement et qualitativement que les apports décrits pour les populations asiatiques ne seraient donc pas forcément bénéfique dans les pays occidentaux dans le cadre de la prévention du cancer du sein et de l'endomètre. Plusieurs travaux montrent l'effet protecteur de la génistéine vis à vis du cancer de la prostate chez l'homme (Zhang et al., 2012 ;

Lazarevic et al., 2012, Steiner et al., 2009). Les données expérimentales sur les modèles animaux de cancers induits par des produits chimiques montrent aussi un effet protecteur de la génistéine, administrée par gavage ou par injection sous cutanée (Hilakivi-Clarke et al., 1999 ; Lamartinière et al., 2002). Néanmoins la génistéine stimule la croissance de cellules tumorales de glandes mammaires (cellules MCF-7) *in vivo* (Ju et al., 2001) et *in vitro* (Allred et al., 2001).

3.5.3.4. Effets sur le comportement

Les œstrogènes et le 17β -œstradiol sont connus pour agir au niveau du cerveau, en affectant le comportement, la cognition, et la viabilité cellulaire (McEwen et Alves, 1999). Le système nerveux central possède d'ailleurs des récepteurs des œstrogènes (Kuiper et al., 1998). Ceci suggère que les phytoestrogènes pourraient avoir les mêmes effets. Une exposition chez les rats en isoflavones via l'alimentation, provoque une diminution de la motivation sexuelle chez les femelles (Patisaul et al., 2001). Cependant l'exposition à la génistéine seule dans les mêmes conditions n'a aucun effet sur le comportement sexuel de femelles (Patisaul et al., 2002) suggérant que c'est le mélange de phytoestrogènes qui serait responsable de la diminution du comportement d'accouplement.

D'autres types de comportements tels que la sociabilité, l'agressivité et l'anxiété, peuvent être affectés par les isoflavones. Par exemple, les rats mâles recevant un régime alimentaire contenant $150\mu\text{g/g}$ de génistéine montrent un comportement anxieux et un taux élevé de vasopressine et de corticostérone dans le plasma, indicateur d'un stress induit (Hartley et al., 2003). Un taux élevé de vasopressine a été retrouvé au niveau de l'hypothalamus de rats ayant consommé pendant toute leur vie un régime contenant $1\ 250\text{ ppm}$ de génistéine (Andrew C et al., 2003). En ce qui concerne le comportement alimentaire, Flynn et al (2000) rapportent que les rats exposés pendant la période de gestation et de lactation à $1\ 250\text{ ppm}$ préféraient la solution saline. Par contre, la génistéine n'a aucun effet sur la préférence au sucre. Une autre étude effectuée dans les mêmes conditions et utilisant la même dose de génistéine confirme ces résultats (Slikker et al., 2001).

3.6. La vinclozoline

La vinclozoline (3-(3, 5-dichlorophenyl)-5-ethenyl-5-methyl-2,4-oxazolidinedione) (Figure 31) est un solide cristallin blanc et sans odeur, très faiblement soluble dans l'eau. La vinclozoline est un fongicide dicarboximide, d'usage non systémique, à action protectrice, commercialisé sous le nom de Ronilan®. Elle est très largement utilisée pour la culture de

nombreux fruits, légumes, pour les vignes, le colza parce qu'elle prévient la germination des spores de *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Monilia*, *Sclerotinia*, *Helminthosporium* et *Corticium* spp.

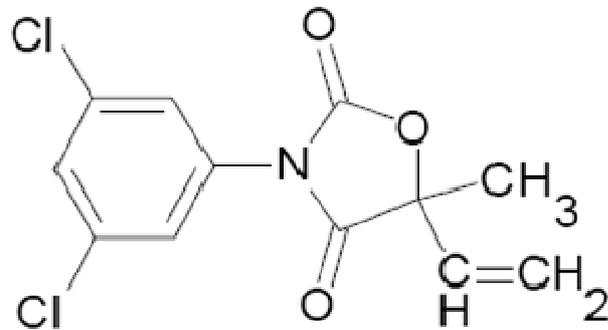


Figure 31: Structure chimique de la vinclozoline

La vinclozoline est instable en milieu aqueux. Elle peut se dégrader en fonction du pH, en deux composés, l'acide 2-[[[(3,5-dichlorophényl)carbamoyle]oxy]-2-méthyl-3-buténoïque, appelé M1, dont la formation est réversible, et l'acide 3',5'-dichloro-2-hydroxy-2-méthylbut-3-énanilide, appelé M2, dont la formation n'est pas réversible (Figure 32). Le produit de dégradation final de la vinclozoline dans l'eau est la 3,5-dichloroaniline (M3) (Szeto et al., 1989). A pH basique, la réaction menant à M1 est favorisée, tandis qu'à pH acide, c'est la production de M2 qui l'est. Les facteurs accélérant l'hydrolyse de la vinclozoline sont la température et un pH basique. Ainsi, à une température de 35°C, à pH 7,5 la demi-vie de la vinclozoline est de 2,8 heures, tandis qu'à pH 4,5 elle est supérieure à 500 heures (Szeto et al., 1989).

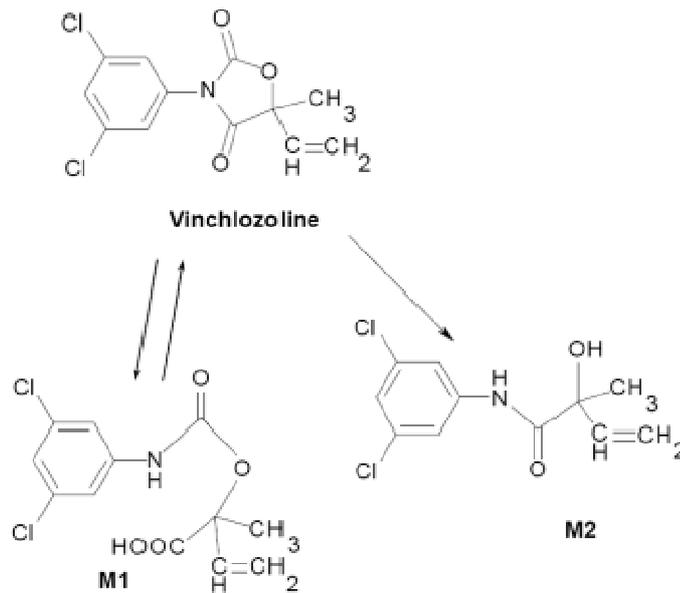


Figure 32: schéma de l'hydrolyse de la vinclozoline en milieu aqueux (Szeto et al., 1989).

3.6.1. Voies d'exposition et métabolisme

La vinclozoline est un fongicide utilisé pour contrôler les maladies de nombreuses plantes. De ce fait, les résidus des traitements phytosanitaires des fruits et légumes constituent la voie de contamination des consommateurs. Après le traitement, les fongicides sont capables de se volatiliser et de circuler dans l'air et l'eau et se fixer sur les denrées alimentaires non traitées, ce qui augmente leur distribution (Baumeister et al., 2002). Les consommateurs ne peuvent pas se rendre compte de leur exposition car les fongicides ne sont pas éliminés des produits frais par un rinçage à l'eau du robinet (Krol et al., 2000), et la transformation commerciale augmente d'autant plus la concentration des résidus (Will et Kruger, 1999).

Cependant les personnes les plus exposées à la vinclozoline restent les ouvriers agricoles travaillant sous serre chez qui l'exposition a été évaluée à 25 mg après 8 heures de travail, et l'exposition dermique à 2,5 mg/jour, ce qui représente des valeurs bien supérieures aux limites autorisées (Nilsson et Papantoni, 1996). L'évaluation de l'exposition de 67 ouvriers travaillant dans la synthèse et la formulation de la vinclozoline dépasse quant à elle, les 25 µg/kg pc/jour (Watson, 1995).

La vinclozoline se transforme par hydrolyse, photolyse ou par le métabolisme des mammifères (Schick et al., 1999; Sierra-Santoyo et al., 2004; Szeto et al., 1989). Cependant les informations sur la biotransformation, la distribution, et l'accumulation de la vinclozoline au niveau du corps des humains et des animaux restent très limitées. Les sérums de rats mâles et de femelles en gestation ayant reçu des doses orales de vinclozoline ont été

analysés, le métabolite majeur retrouvé était le M1 alors que de faibles concentrations de vinclozoline et de M2 ont été détectées (Kelce et al., 1994 ; Monosson et al., 1999). Bursztyka et al (2008) ont retrouvé majoritairement au niveau des foies de rats exposés à la vinclozoline, un autre métabolite qui est le M5 3',5'-dichloro-2,3,4-trihydroxy-2-methylbutyranilide. La vinclozoline ainsi que ses deux métabolites M1 et M2 ont été détectés dans plusieurs fluides biologiques (plasma, sérum, et urine) de souris (Dhananjeyan et al., 2006). Les métabolites M1 et M2, sont retrouvés dans le lait maternel de rattes femelles lors d'une exposition *in utero* suggérant ainsi que les métabolites de la vinclozoline peuvent être transmis aux nourrissons lors de l'allaitement (Cravedi, PNRPE Workshop, Angers, 2010).

3.6.2. Propriétés anti-androgéniques

La vinclozoline a été décrite comme un puissant antagoniste du récepteur des androgènes *in vitro* et *in vivo* (Kelce et al., 1997 ; Gray et al., 1999 ; Monosson et al., 1999 ; Wolf et al., 2000 ; Nellemann et al., 2003). *In vitro* le M2 serait le plus puissant antagoniste de l'AR suivi de la vinclozoline et enfin du M1. Le M2 est aussi antagoniste du PR, GR et du MR et il est capable également de se fixer sur le récepteur oestrogénique ER α et d'agir comme un agoniste. La vinclozoline, quant à elle, peut être aussi antagoniste du MR et du PR (Molina-Molina et al., 2006). Ces observations quant à l'interaction de la vinclozoline et de ses métabolites sur d'autres récepteurs que le AR suggèrent qu'ils peuvent présenter des activités hormonales multiples.

L'exposition *in utero* à une forte dose de vinclozoline féminise les rats nouveaux nés, selon plusieurs marqueurs : distance anogénitale réduite, tétons féminisés permanents, hypospadias, testicules topiques, poche vaginale (Gray et al., 1994). A des doses plus faibles (à partir de 6,5 mg/kg/j) administrées chez les rats adultes on retrouve une réduction du poids de la prostate et des tétons féminisés (Gray et al., 1999). Enfin il a été observé que la vinclozoline induisait chez les souris CD-1 mâles exposés *in utero* à la dose 1mg/kg/j une réduction de la distance ano-génitale, du poids de la prostate et des testicules (Elzeinova et al., 2008).

3.6.3. Effets physiologiques

3.6.3.1. Effets sur la fertilité et la reproduction

Les études de reproduction ont révélé que la plus faible NOAEL de la vinclozoline est de 4mg/kg pc/jour (WHO-JMPR, 1995). Cependant l'agence américaine de protection de l'environnement (EPA) en 2003 a fixé la dose de 1,2 mg/kg/pc/j comme dose sans effet toxique observable en se basant sur les études de toxicité chronique, de carcinogénicité, et de reproduction chez le rat (U.S.EPA, 2003).

Des études multigénérationnelles chez le rat montrent qu'une exposition *in utero* et lactationnelle à la dose 1000 ppm démasculinise les nouveaux nés mâles (van Ravenzwaay, 1992) ; les effets incluent une réduction de la distance ano-génitale, une hypospadias, un pénis hypoplasique, une réduction de la taille des testicules, une réduction des glandes accessoires mâles, et un orifice vagin-like. Des effets similaires ont été rapportés sur deux générations (Matsuura et al., 2005); aucun effet sur la spermatogénèse n'a été observé au niveau de la F0 ou de la F1 bien que certains mâles de la F1 étaient stériles. Gray et al (1994) réduisent la période d'exposition en administrant deux fortes doses de vinclozoline (100 et 200 mg/kg/pc/j) du 14^{ème} jour de gestation jusqu'au 3^{ème} jour après la naissance (PND 3). Les nouveaux nés mâles ont montré des malformations du tractus génital dose-dépendantes. Un peu plus tard Wolf et al (2000) ont défini la période fœtale du développement sexuel mâle la plus sensible à la vinclozoline, en exposant les rats aux doses 200 et 400 mg/pc/j du 21^{ème} jour de gestation jusqu'au 21^{ème} jour postnatal. Ils ont remarqué que la période la plus sensible était entre le 16^{ème} et le 17^{ème} jour de gestation avec des effets sévères qui ont affecté 100% des mâles. Les effets incluent des malformations du tractus génital, la présence de mamelons, une réduction du poids des glandes sexuelles accessoires. Dans une autre étude dose-réponse (Ostby et al., 1997) des rattes femelles ont été exposées par gavage du 14^{ème} jour de gestation au PND3 avec des doses décroissantes de vinclozoline, 0 ; 3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100 mg/kg/pc/j. Chez les mâles nouveaux nés, la réduction de la distance ano-génitale a été observée à partir de la dose 3,125 mg (kg/pc/j), la rétention des aréoles et des mamelons à partir de la dose 6,25 mg (kg/j), la diminution du poids de la prostate ventrale et l'hypospadias à la dose 50 mg (kg/pc/j). La malformation des testicules n'a été retrouvée qu'aux doses 100 et 200 mg (kg/pc/j) comme les effets sur la concentration de la testostérone et la spermatogénèse. Cependant l'administration d'une faible dose de vinclozoline (1mg/kg/pc/j) à des souris CD1 pendant la gestation (15^{ème} au 22^{ème} jour) et pendant la puberté (23^{ème} au 44^{ème} jour) provoque la diminution du nombre de spermatozoïdes, des anomalies de la tête des spermatozoïdes, et la modification de l'expression du gène de l'acrosome et des gènes de l'apoptose (p53, p21) aussi bien chez le groupe exposé pendant la gestation que chez le groupe exposé pendant la puberté (Elzeinova et al., 2008). Lehraiki et al (2010) ont utilisé cette même faible dose de vinclozoline (1mg/kg/pc/j) pour exposer les femelles depuis la gestation jusqu'au 3^{ème} jour postnatal, et ont montré une altération de la stéroïdogénèse et de la gamétogénèse avec une diminution de la sécrétion de la testostérone et une diminution du nombre de gonocytes.

L'exposition directe à la vinclozoline a révélé quant à elle, des effets similaires à ceux observés *in utero*. En effet l'exposition avant la puberté de rats mâles aux doses 30 et 100 mg/kg/pc/j retarde la puberté et la croissance des glandes accessoires et de l'épididyme

et diminue la production de la testostérone, de la LH et de l'œstradiol (Monosson et al., 1999). Le traitement de rats mâles pendant la puberté (35^{ème} jour au 44^{ème}) aux doses 100 ou 200 mg/kg/pc/j provoque une réduction du poids de la prostate, de l'épididyme, de la vésicule séminale, une hypertrophie des cellules de Leydig, des débris et des cellules dépouillées dans l'épididyme et une diminution de la concentration sérique de testostérone. A une plus forte dose (400mg/kg/pc/j) une diminution des paramètres des mouvements des spermatozoïdes, y compris la vitesse curviligne, a été observée (Yu et al., 2004).

En conclusion la vinclozoline administrée expérimentalement (*in vivo*) à des doses diverses, par des voies d'administration diverses, et avec des périodes d'exposition diverses (gestation, lactation, puberté, adulte) produit un large spectre d'effets délétères sur la reproduction mâle : réduction de la distance anogénitale (DAG), persistance des mamelons, hypospadias, diminution du poids de la prostate, des vésicules séminales et de l'épididyme, et diminution du nombre de spermatozoïdes.

En ce qui concerne les effets sur la reproduction féminine, l'exposition à la vinclozoline à la dose 50 mg/kg/pc/j du 13^{ème} jour de gestation jusqu'au 17^{ème} provoque une virilisation des embryons femelles (19^{ème} jour embryonnaire) de souris CD1 qui présentent de longs urètres par rapport aux embryons femelles témoins (Buckley et al., 2006).

Une autre étude sur 3 générations a montré que l'administration de la vinclozoline du 8^{ème} jour de gestation jusqu'au 14^{ème} jour à la dose 100mg/kg/pc/j provoque chez les femelles de la génération F1 à F3 des avortements spontanés, une pâleur très prononcée et même une léthargie, et des saignements vaginaux (Nilsson et al., 2008).

3.6.3.2. Effets sur la cancérogénèse

La vinclozoline est classée comme un produit chimique du Groupe C - cancérogène humain possible. Des études chroniques et de cancérogénicité ont démontré un développement de tumeurs des cellules de Leydig chez le rat et des carcinomes hépatiques à de fortes doses de vinclozoline (US.EPA, 2000). Selon le rapport de l'EPA c'est le métabolite M2 de la vinclozoline qui est considéré comme ayant un mode génotoxique inducteur de tumeurs.

Des études plus récentes sur plusieurs générations ont révélé qu'une exposition *in utero* lors de la formation des gonades (du 8^{ème} jour de la vie embryonnaire au 14^{ème} jour) à la dose 100 mg/kg/pc/j provoque l'apparition de tumeurs au niveau des glandes mammaires chez les femelles de la génération F1 à la génération F4 (Anway et al., 2006) et également des modifications épigénétiques de l'expression génique des gènes responsables du cancer de la prostate au niveau de la F3 (Anway et al., 2008).

3.6.3.3. Effets sur le comportement

L'exposition périnatale aux androgènes a des effets sur la morphologie et la physiologie de l'animal adulte. Chez le rat, plusieurs comportements sont masculinisés par la conversion de la testostérone en œstradiol au niveau du cerveau. Cependant, certains comportements comme « le jeu » sont spécialement contrôlés par les androgènes. La période critique chez le rat concernant la mise en place du comportement du « jeu » est la période néonatale. Les études ont montré que l'augmentation du « jeu » chez les mâles était due à une stimulation de l'AR au niveau de la région amygdale du cerveau (Meaney et al., 1983). De plus, le dysfonctionnement de l'AR comme la castration néonatale, les testicules mutants féminisés, et l'exposition néonatale au flutamide, un anti-androgène, diminuent le jeu chez les jeunes rats mâles (Meaney et Stewart 1981) et il semblerait que le comportement du jeu soit contrôlé par les androgènes durant la période néonatale et qu'il ne soit pas influencé par l'activation d'autres hormones stéroïdiennes. Dans ce cadre là, des expérimentations utilisant des antagonistes de l'AR ont été entreprises. L'administration par gavage de 200 mg/kg/pc/j de vinclozoline aux PND2 et 3, à des rats mâles et femelles provoque une diminution du comportement du « jeu » chez les jeunes mâles. (Hotchkiss et al., 2003). Une étude transgénérationnelle sur le comportement sexuel montre que l'exposition à 100mg/kg/pc/j pendant la gestation perturbe le comportement sexuel des femelles qui préfèrent s'accoupler avec des rats mâles dont les ancêtres n'ont pas été exposés à la vinclozoline (Crews et al., 2007). Une autre étude transgénérationnelle utilisant 100mg/kg/pc/j par voie intra-péritonéale pendant la gestation rapporte une diminution du comportement anxieux chez les rats mâles de la F3 et inversement une augmentation chez les femelles (Skinner et al., 2008). Ces études sur plusieurs générations constituent un important modèle dans l'étude des altérations de la programmation épigénétique du transcriptome du cerveau par les PE.

Concernant le comportement alimentaire, une seule étude a été réalisée en utilisant des tests de préférence à des solutions aromatisées. La plus forte dose de vinclozoline (60mg/kg/pc/j) administrée aux rats via l'alimentation du 7^{ème} jour de gestation jusqu'au 77^{ème} jour postnatal provoque une augmentation de la préférence à la solution de saccharose dans la descendance avec un effet plus prononcé chez les femelles. Par contre, aucun effet n'a été observé quant à la consommation d'une solution de sodium (Flynn et al., 2001).

3.7. Mélange génistéine vinclozoline

La faune sauvage et l'homme sont exposés de façon permanente à de multiples substances qui pourraient avoir des effets combinés à des doses faibles. L'exposition à la combinaison génistéine/vinclozoline constitue un bon modèle expérimental pour évaluer les risques pour l'homme, puisque ces deux molécules, comme nous l'avons indiqué

précédemment, peuvent être ingérées en même temps lors d'un régime alimentaire comportant du soja et des fruits et légumes ayant été traités avec la vinclozoline.

La première étude utilisant un mélange de génistéine et de vinclozoline est celle de Vilela et al (2007) qui ont montré, que la combinaison de la génistéine (0,17 mg/kg/pc/j) et la vinclozoline (10mg/kg/pc/j) produit une hypospadias chez les embryons de souris mâles pendant la gestation du 13^{ème} au 17^{ème} jour.

Notre étude fait partie du PNRPE (Programme National sur les Perturbateurs Endocriniens) qui comprend plusieurs études sur l'effet du mélange génistéine vinclozoline sur plusieurs organes. Eustache et al (2009), ont montré que la génistéine seule et la vinclozoline seule à la dose 1mg/kg/pc/j n'ont pas d'effet sur la reproduction des rats mâles adultes (80j) exposés *in utero* alors que le mélange des deux molécules à la même faible dose produisait un effet synergique sur le nombre des spermatozoïdes et leur mobilité et sur l'expression des gènes impliqués dans la fertilité. En utilisant la même procédure expérimentale mais en observant les effets, cette fois, sur les rats nouveau-nés, Lehraiki et al (2011) ont révélé que seule la vinclozoline produisait des effets délétères et que le mélange n'avait aucun effet sur la reproduction des nouveau-nés mâles, suggérant que la génistéine a antagonisé l'effet délétère de la vinclozoline à ce stade bien précis du développement.

Les effets sur la glande mammaire ont été récemment étudiés par El Sheikh Saad et al (2011). Leurs résultats indiquent que le mélange des deux substances produit une ramification et une prolifération épithéliale des canaux, et des bourgeons terminaux plus larges au niveau des glandes mammaires des femelles au stade PND35, ainsi qu'une hyperplasie canalaire chez les femelles au stade PND50.

Contexte et objectifs de la thèse

L'ensemble de ces données bibliographiques nous a amenés à considérer les glandes salivaires comme des cibles potentielles des perturbateurs endocriniens.

Cette hypothèse est soutenue parce que :

1/ *Les organes sensoriels, y compris les glandes salivaires, sont en liaison étroite avec les organes reproducteurs.* Chez les mammifères, le système olfactif et la salive interviennent dans la perception de phéromones (Romero et Beltramino, 1990 ; Thavathiru et al., 1993) et la démonstration d'une interaction entre les glandes salivaires et les gonades est déjà ancienne (Wilson et Goldstein, 1972). Tout comme le système olfactif, le système

gustatif est également sous contrôle des hormones sexuelles, la perception gustative variant selon l'âge et le statut physiologique (grossesse, ménopause). Le comportement alimentaire est également lié au sexe puisqu'il existe des différences sexuelles dans la prise de solutions sucrées et salées (Curtis et al., 2004). Les hormones stéroïdiennes et en particulier les œstrogènes et la prolactine conditionnent la prise alimentaire en agissant sur l'hormone de satiété.

2/ Les effets des perturbateurs endocriniens sur le comportement ont été décrits tant avec la génistéine qu'avec la vinclozoline. Ces deux molécules exercent des effets physiologiques allant d'une altération du fonctionnement de certains organes (organes reproducteurs, glande mammaire) à une modification du comportement (alimentaire, sexuel ou social).

Dans la mesure où les glandes salivaires sont en liaison étroite à la fois avec les organes reproducteurs et avec le comportement, elles apparaissent aussi comme cibles potentielles des PE, mais cet aspect n'a jamais, à ce jour, été étudié, et c'est l'originalité de ce travail.

Au regard de notre synthèse bibliographique, il existe différentes périodes du développement où l'organisme humain est sensible à une exposition à des produits chimiques mais la sensibilité et les effets des PE sont souvent plus accentués lorsque les expositions ont lieu aux stades précoces de la vie. Ces périodes " critiques " du développement se caractérisent par la régulation hormonale de la différenciation et de la prolifération des cellules dans les organes et les tissus en formation au cours de la vie embryonnaire, régulation qui dépend de l'apport hormonal via la mère.

Expérimentalement, on sait que les effets hormonaux d'une exposition *in utero* et lactationnelle à des perturbateurs endocriniens portent généralement sur la distance anogénitale, l'avancement de la puberté, la réduction de la fertilité et même sur l'induction de cancers hormono-dépendants (voir dans Cravedi et al., 2007). C'est au cours de cette période fœtale que sont également « programmées » la plupart des grandes fonctions physiologiques et comportementales, qui seront ensuite régulées jusqu'aux étapes de vieillissement.

Une des caractéristiques de l'exposition alimentaire est qu'elle apporte simultanément de faibles doses de phytoestrogènes (légumes, céréales, soja et dérivés) et de xénohormones (résidus de pesticides, contaminants...), ces composés ayant pour la plupart des effets œstrogénique et/ou anti-androgéniques. Par ailleurs, les études sur l'effet de mélanges de

PE combinant des propriétés oestrogéniques et anti-androgéniques montrent que ces combinaisons peuvent produire des effets très différents de ceux attendus pour chaque molécule prise séparément (Kortenkamp et al., 2007).

L'objectif de cette thèse est donc de mettre en évidence les glandes salivaires comme cible biologique des PE œstrogénique et /ou anti-androgéniques sur un modèle d'exposition expérimentale qui permette d'évaluer les effets à différents stades du développement.

L'étude d'une telle exposition a été justement abordée dans le cadre du programme national français (2005-2009) PNR-PE associant un phytoestrogène, la génistéine, et un anti-androgène, la vinclozoline. Il s'agit d'un projet multidisciplinaire associant différentes équipes de recherches pour comparer les effets des molécules seules à celui du mélange sur plusieurs cibles biologiques réputées pour être sensibles aux faibles doses et qui sont impliquées dans le développement et le comportement. Ces cibles incluaient l'appareil reproducteur mâle, la glande mammaire, mais aussi des études sur le squelette. Les effets ont été explorés dans deux conditions d'exposition : une exposition précoce, qui débute dès le premier jour de la conception et se poursuit jusqu'au sevrage, et une exposition plus tardive, qui débute au sevrage et se poursuit jusqu'au début de l'âge adulte.

Nous avons donc saisi l'opportunité de nous insérer dans ce projet pour initier l'étude de l'effet de ces différentes expositions en génistéine et/ou vinclozoline sur la glande submandibulaire de rats mâles et femelles pour lesquels nous disposerons des résultats sur les autres organes.

- La première exposition gestationnelle et lactationnelle, vise à déterminer l'effet des molécules sur le développement et la morphogénèse de la glande salivaire submandibulaire lors d'une exposition indirecte via la mère.
- La deuxième exposition du sevrage à l'âge adulte est sensée nous informer sur les effets directs des deux PE sur la plasticité structurale et fonctionnelle des glandes submandibulaires.

L'objectif ultime de cette étude était de déterminer l'impact de la perturbation endocrinienne sur le comportement alimentaire avec des tests de préférence gustative afin de définir les effets sur la prise et la sélection alimentaire, en particulier au niveau des préférences sucrées, et de relier ces impacts aux effets observés au niveau des glandes salivaires submandibulaires grâce à une approche histologique des structures et une approche moléculaire des gènes impliqués dans la gustation.

Ces données présentent un intérêt particulier puisqu'il serait possible de les transposer à l'homme, et qu'elles concernent plus particulièrement la sécurité alimentaire. Par exemple, chez l'homme, une exposition à une alimentation renfermant des xénohormones (phyto-œstrogènes, résidus de pesticides, plastiques...) pendant la grossesse pourrait orienter les préférences gustatives des enfants.

Ces travaux présentent également un intérêt pour les personnes âgées, les femmes en ménopause, voire certains patients confrontés au problème de sécheresse buccale. Chez ces personnes, une moins bonne efficacité des glandes salivaires et de leurs sécrétions peut être la cause d'une chute des hormones ou une altération de l'équilibre endocrinien.

***MATERIELS
ET
METHODES***

1. Matériel biologique

Les rats utilisés sont de race Wistar Han et ils sont fournis par la société Harlan France SARL (Gannat, France). Pour éviter toute contamination par des résidus xénohormones ils sont maintenus individuellement dans des cages en polypropylène et ont accès *ad libitum* à un régime semi-synthétique (Annexe 1), à une eau filtrée sur charbon actif. La litière est en sciure de peuplier. Ces conditions permettent de s'affranchir d'une éventuelle contamination par des perturbateurs endocriniens via l'alimentation (phytoestrogènes, pesticides) ou l'environnement (bisphénol A, phtalates) Les animaux sont acclimatés à l'animalerie au moins 2 semaines avant chaque expérience.

Depuis leur réception jusqu'à la fin de l'expérimentation, ils sont hébergés dans une animalerie E.O.P.S (exempte d'organisme pathogène spécifique) à 22°C, 55% d'humidité relative et avec un rythme jour/nuit de 12/12 heures

2. Produits et réactifs chimiques

2.1. Molécules étudiées

La génistéine a été synthétisée avec une pureté de 99% et a été fournie par l'Université de Bordeaux 1 (Talence, France). La vinclozoline a été extraite à partir du produit commercial Ronilan® (BASF, Levallois-Perret, France) par le laboratoire Toxalim (INRA-Toulouse) selon la méthode décrite par Bursztyka et al., (2008). L'extrait a été séché sous vide, puis recristallisé à partir du méthanol. Sa pureté a été vérifiée par HPLC-DAD (192–400nm). L'absence des produits de dégradation de la vinclozoline M1 et M2 a été vérifiée par LC-MS.

2.2. Réactifs d'histologie et d'immunohistochimie

La matrice cryo protectrice OCT™ provient de Labonosol (004511241). Le fixateur utilisé est le Rapid-Fixx™ (Thermo : 230014). Les colorants histologiques l'hémalum de Mayer est issu de Merck (1.09242.0500), la Fuchine Ponceau de Diapath (C0443), l'acide phosphomolibdique 1% de Diapath (G0012), le Vert Lumière de Diapath (CO702). Le Safesolv provient de Labonord (0699464) et le baume Safemount Labonord (0647520). Pour l'immunohistochimie le kit Novolink Polymer Detection System des laboratoires Novocastra (RE7140-K) a été utilisé. L'anticorps anti-Ki-67 provient de Dako (Glostrup, Danemark). L'acétone a été utilisé comme fixateur et il est de chez Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France). Le produit de montage EUKITT est de la marque O. Kindler GmbH (Allemagne). Le TBS Tween provient de Dako (France).

2.3. Produits de biologie moléculaire

Le réactif TRIzol® provient de Invitrogen (Cergy Pontoise, France), l'isopropanol et le chloroforme proviennent de chez Sigma Aldrich (France), le Kit DNase, le kit iScript™ Advanced cDNA et la SYBR Green Supermix de BioRad (France), et l'eau pour biologie moléculaire de Eurobio (France).

2.4. Réactif du dosage ELISA de l'EGF sérique

Le kit Elisa dosage EGF provient de Peprotech (USA), les plaques ELISA de Thermo Scientific (France), la solution substrat ABTS de Sigma (France), le tampon PBS (x10) de Gibco BRL (France), le Tween-20 de Sigma (France), et la BSA de Sigma (France).

3. Traitement des animaux

Les protocoles expérimentaux ont été conçus dans le respect de l'éthique animale et ont été validés par le comité d'éthique de l'Université de Bourgogne.

3.1. Exposition gestationnelle et lactationnelle

3.1.1. Suivi expérimental

- ***Accouplement et constitution des lots***

Soixante rats femelles et soixante rats mâles de 10 semaines sont acclimatés pendant deux semaines avant l'accouplement. L'accouplement est réalisé par paires (un mâle et une femelle par cage) pendant une semaine. Les femelles sont examinées quotidiennement pour déterminer le premier jour de gestation, défini par la présence du bouchon vaginal ou par la présence de spermatozoïdes dans les prélèvements vaginaux (réalisés à l'aide d'une pipette automatique et de 50 µL de sérum physiologique). Les femelles gestantes sont réparties au hasard en quatre groupes correspondant au groupe contrôle (CTRL), au groupe génistéine (GEN), au groupe vinclozoline (VIN) et au groupe génistéine+vinclozoline (GEN+VIN) (11 à 14 femelles gestantes par groupe).

- ***Naissances***

Le jour de la parturition, les portées sont pesées, sexées, et normalisées à dix petits (5 mâles et 5 femelles). Depuis le premier jour de gestation jusqu'au sevrage (21^{ème} jour postnatal J21), les femelles gestantes reçoivent les xénohormones par gavage à la dose 1mg/kg pc/jour seule ou en combinaison. La génistéine ou/et la vinclozoline sont dissoutes dans l'huile de maïs (Carrefour, Dijon, France) et 2 ml/kg pc sont administrés aux femelles. Les animaux contrôles reçoivent le même volume avec de l'huile seule. Afin de prévenir une

éventuelle photolyse ou une oxydation les solutions sont conservées dans des feuilles de papiers aluminium à -4°C.

- **Sevrage et constitution des lots**

Le jour du sevrage (J21), les animaux sont répartis en lots de 12 mâles et 12 femelles (un mâle et une femelle prélevés par portée) ; en séparant les mâles des femelles. Ils sont identifiés par des puces électroniques implantées sous la peau et sont rassemblés dans des cages en polypropylène (cinq par cage). Ils ont un accès *ad libitum* à l'eau filtrée sur charbon actif et au même régime L5 dépourvus de phytoestrogènes jusqu'au jour du sacrifice. Le poids corporel et la consommation alimentaire sont mesurés deux fois par semaine. Les animaux mâles sont sacrifiés à deux stades du développement : un stade immature à J25 et un stade adulte à J100. Les femelles sont sacrifiées aussi à deux stades J35 et J50 (Figure 33).

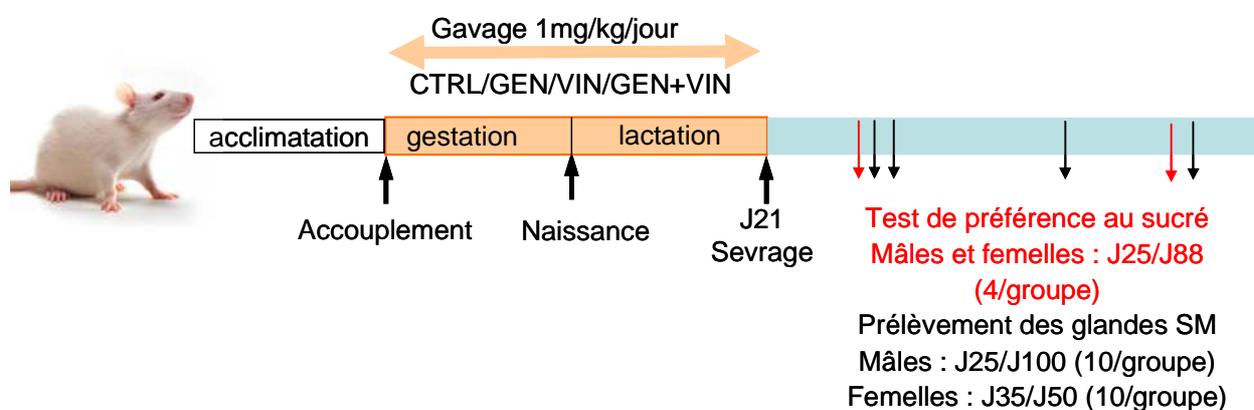


Figure 33: Protocole expérimentale de l'exposition gestationnelle et lactationnelle.

3.1.2. Paramètres mesurés en cours d'expérimentation

- **Distance anogénitale**

La distance anogénitale (DAG), un critère anatomique de l'exposition aux perturbateurs endocriniens, est mesurée au sevrage à J21 à l'aide d'un pied à coulisse électronique (Omni-Tech, France), toujours par le même expérimentateur (Figure 34).

- **Date d'apparition de la puberté**

Afin de déterminer le moment de la puberté, les femelles retenues pour l'étude (soit une femelle par portée) ont été observées quotidiennement à partir de J21 jusqu'à l'apparition de l'ouverture vaginale (OV), (Figure 35A). Concernant les mâles, la puberté est définie par la séparation du prépuce (Figure 35B). Pour déterminer le moment de la puberté, les mâles ont été observés quotidiennement à partir de J30 jusqu'à la séparation complète du prépuce.

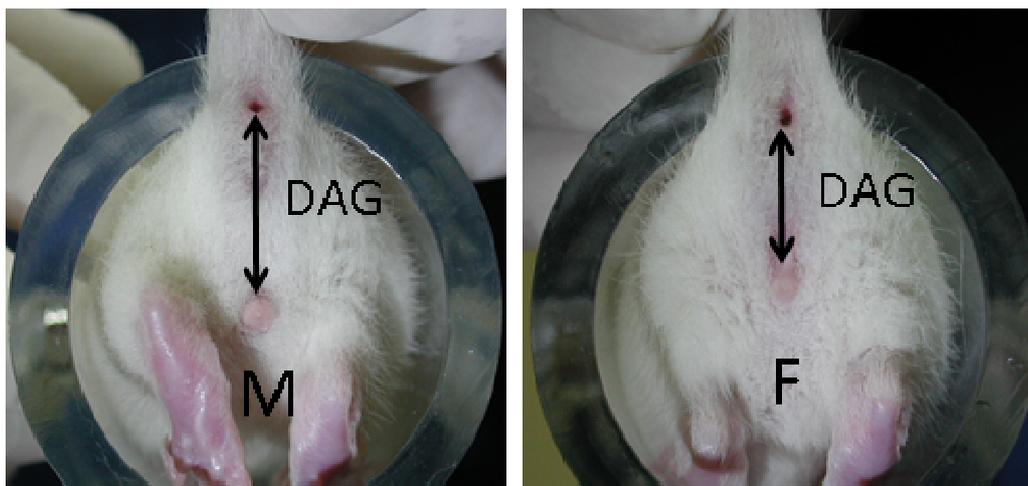


Figure 34 : Mesure de la distance anogénitale (DAG) chez le mâle (M) et chez la femelle (F).

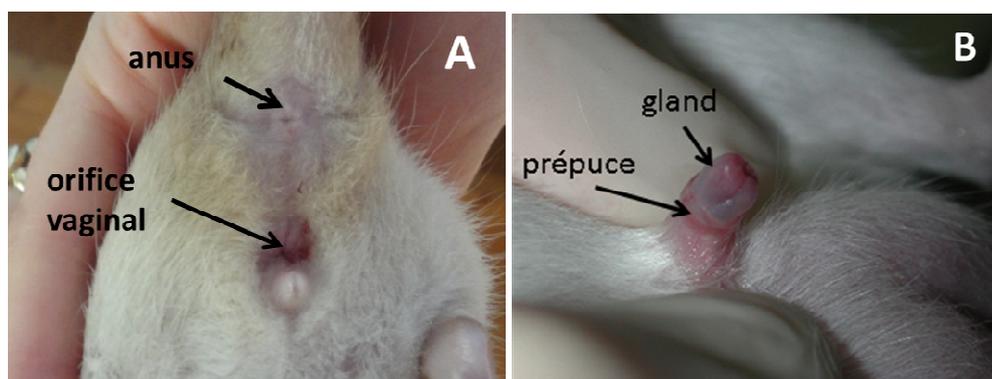


Figure 35 : Détermination de l'âge de la puberté par l'observation de l'ouverture vaginale (A) et de la séparation du prépuce (B).

- **Préférence gustative**

La préférence au sucré (consommation de saccharine 0,3% est mesurée après le sevrage, c'est-à-dire au stade immature (J21-J25), avant l'apparition des premiers signes pubertaires, et à l'âge adulte (J85-J88) pendant les jours qui précèdent le sacrifice.

3.1.3. Sacrifices et prélèvements

- **Euthanasie et sang**

Le jour du sacrifice, les animaux sont pesés avant d'être anesthésiés à l'isoflurane (2,5%). Ils sont euthanasiés par l'ouverture de la cage thoracique après exsanguination à l'aorte dorsale. Le sang, est récolté dans des tubes héparinés à 0°C, est centrifugé à 900g pendant 10 min afin de récupérer le sérum. Celui-ci (phase supérieure) est fractionné en aliquotes de 500µl dans des tubes Eppendorfs et conservé à -20°C.

- **Les glandes salivaires submandibulaires**

Une incision est réalisée au bas du cou pour soulever la peau, et faire une ouverture jusque sous la mandibule ; les glandes sous maxillaires sont ensuite soigneusement dégagées d'une membrane graisseuse. Les glandes sublinguales, qui sont accolées à la submandibulaire, sont délicatement décrochées sous loupe binoculaire et les glandes sous maxillaires sont ensuite excisées, puis pesées. Les SM gauches sont immédiatement congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C pour la PCR temps réel. Les SM droites ont été incorporées dans OCTTM (Labonosol, France) et congelées (entre -56 à -62°C) dans un bain d'isopentane (Thermo / Shandon Histobath, Cergy Pontoise, France), puis gardées à -80 °C pour l'analyse histologique et immunohistochimique.

3.2. Exposition directe du sevrage jusqu'à l'âge adulte

3.2.1. Modalités d'exposition

- **Accouplements et mise bas**

Soixante rats Wistar mâles et soixante rats femelles âgés de 10 semaines sont acclimatés pendant 15 jours au régime semi synthétique L5 (INRA, Jouis en Josas). Ils sont mis en couple (1male/1femelle) pour une période maximale de 14 jours. Les mâles sont retirés dès que l'accouplement a été constaté comme décrit précédemment. Les femelles sont isolées dès l'accouplement jusqu'à la naissance. A la naissance, les portées sont pesées et sexées puis alignées à 10 animaux (5 mâles et 5 femelles). L'excédent des nouveau-nés est sacrifié.

- **Sevrage et constitution des lots**

Au sevrage (J21), les jeunes ratons sont répartis en plusieurs groupes de 12 mâles et 12 femelles (un animal par portée dans chaque groupe), le groupe contrôle (CTRL) ; le groupe génistéine (GEN), le groupe vinclozoline (VIN) et le groupe génistéine+vinclozoline (GEN+VIN). Ils ont un accès *ad libitum* à l'eau filtrée sur charbon actif et au régime L5. Ils sont gavés tous les deux jours avec les molécules d'intérêt (1mg/kg/j), à savoir la génistéine, la vinclozoline, ou les deux en mélange. La génistéine ou/et la vinclozoline sont dissoutes dans l'huile de maïs (Carrefour, Dijon, France) et 2 ml/kg/j sont administrés aux rats. Les animaux du groupe contrôle reçoivent le même volume avec de l'huile seule. Les gavages sont poursuivis jusqu'à l'âge adulte (J100) (Figure 36).

- **Paramètres d'observation**

La croissance et la prise alimentaire sont suivies par des mesures bihebdomadaire du poids des animaux et de leur nourriture. La préférence au sucré est mesurée au stade de maturité pubertaire (J50), stade pour lequel le développement structurel des organes

d'intérêt est accompli (cerveau, la glande mammaire, la glande salivaire) à l'âge adulte (J88)).

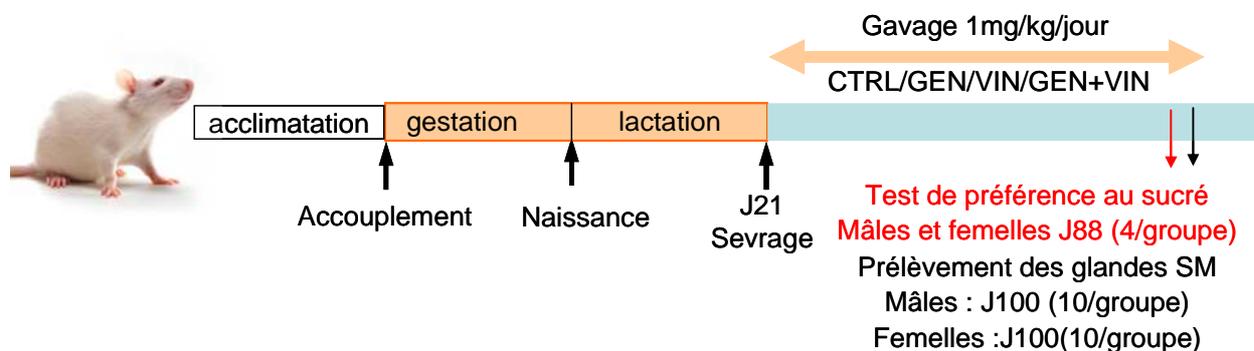


Figure 36 : Protocole expérimentale de l'exposition directe adulte.

- **Sacrifices et prélèvements**

A J100 les rats mâles et femelles sont sacrifiés. Tout comme précédemment, ils sont d'abord anesthésiés à l'isoflurane (2,5%), le sang est récolté par l'exsanguination de l'aorte dorsale, afin de récupérer les sérums, et les glandes salivaires submandibulaires sont ensuite soigneusement excisées, puis pesées et stockées pour analyse, tout comme précédemment décrit.

4. Test de préférence au sucré

Le test de préférence au sucré en général consiste à mettre les rats en présence de deux biberons (Ferguson et al 2009 ; Curtis et al 2004) dont un contient de l'eau (solution témoin) et le deuxième contient la solution gustative. Pour notre étude nous avons choisi la saveur sucrée en utilisant une solution sucrée contenant 0,3% de saccharine (contrairement au saccharose, elle permet de s'affranchir de tout effet post-ingestif sur la prise alimentaire).

Avant de commencer le test, les rats sont mis en présence de deux biberons contenant seulement l'eau durant les deux premiers jours (phase d'adaptation). Le test dure 3 jours, chaque jour on change la position des deux biberons (eau/solution de saccharine). Toutes les solutions sont données à température ambiante. Les biberons sont pesés quotidiennement, la consommation est ramenée au poids du corps.

La préférence est exprimée en pourcentage, et elle est calculée à partir de la formule :

$$[\text{Consommation de la solution} / \text{Consommation totale} \times 100]$$

5. Les paramètres histologiques

5.1. Coloration Trichrome de Masson variante vert lumière et comptages histologiques

Les glandes submandibulaires sont enrobées par une matrice cryo protectrice OCT™ ensuite trois coupes fines transversales de 5 µm d'épaisseur sont alignées sur une lame de verre réalisées à l'aide d'un cryostat (LEICA CM 3050S) dont la température de la chambre est fixée à -20°C et celle de l'objet à -18°C (Cette différence de température permet l'adhérence des coupes sur les lames en verre). Puis les lames contenant les coupes sont stockées en boîtes et à -20 °C jusqu'à leur utilisation sans séchage préalable.

Les lames à colorer sont ensuite sorties du congélateur et laissées à décongeler à température ambiante pendant quelques minutes puis elles sont imprégnées pendant 5 à 7 secondes dans une solution de fixation Shandon Rapid-Fixx™. Ensuite, pour éliminer la matrice d'enrobage hydrosoluble Shandon Cytomatrix™, les lames sont passées pendant quelques minutes dans l'eau distillée avant de subir une coloration nucléaire dans un bain d'hémalum de Mayer pendant 1 minute et 15 secondes ; elles sont lavées 5 à 15 minutes dans un bain d'eau du robinet puis rincées dans l'eau distillée pendant 30 secondes. Pour colorer les canaux excréteurs et les acini séreux, les lames sont passées dans une solution de Fuchsine-Ponceau pendant 5 minutes puis rincées deux fois à l'eau distillée pendant 30 secondes pour éliminer les colorants en excès. Pour une meilleure fixation du colorant, une étape de mordantage est nécessaire par un passage dans un bain d'acide phosphomolybdique 1 % pendant 3 minutes suivi d'une coloration directe sans passage dans l'eau avec une solution Vert Lumière pendant 1 minute et 30 secondes, qui colore les fibres de collagène. Le colorant en excès est éliminé en plongeant les lames dans deux bains successifs d'acide acétique à 1%.

Afin de déshydrater les coupes, avant que les lamelles ne soient montées sur les lames, deux passages dans l'éthanol 95° puis 100° et un passage dans le Safesolv. Les lamelles sont montées sur les lames grâce à du baume Safemount (ne contient pas de xylène). Une goutte de baume est déposée sur la lamelle puis la lame est retournée sur cette dernière. Les lames sont alors séchées pendant 24h minimum à température ambiante puis nettoyage de l'excès de Baume de montage.

Les coupes sont observées sous microscope optique (Nikon Eclipse E 600) doté d'une caméra digitale (Nikon) relié à un système informatique. Le comptage des différentes structures histologiques aux différents stades du développement et la détermination de leurs aires s'effectuent à l'aide d'un logiciel (NIKON DXM1200 c NIS-Éléments BR 3.0) au

grossissement X40. Afin de systématiser le comptage 30 champs sont choisis sur chaque coupe et une moyenne est effectuée sur 3 coupes par animal.

L'aire du champ X40 est déterminée ($=0,0285 \text{ mm}^2$) afin d'exprimer le nombre des structures par unité de surface (nombre/ mm^2) et les aires sont directement déterminées directement sur le logiciel et sont exprimées en μm^2 .

5.2. Immunohistochimie (Ki-67)

Cette technique permet de mettre en évidence certaines protéines cellulaires, qu'elles soient cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires, spécifiques pour un type ou une fonction cellulaire, à l'aide d'une réaction antigène – anticorps, le complexe formé étant rendu visible, donc localisable, par un marqueur coloré. Dans notre étude le Ki-67 est présent au niveau des noyaux, c'est un marqueur de la prolifération cellulaire.

Cette technique est basée sur la liaison spécifique de l'anticorps utilisé avec la molécule antigénique à étudier. Le complexe Ag-Ac est visualisé par une technique d'amplification utilisant un anticorps secondaire (dans notre cas l'anticorps secondaire est couplé à un polymère) lié à un marqueur (une enzyme comme la peroxydase de Raifort par exemple ou HRP) permettant d'augmenter la sensibilité de la détection (Figure 37). Le complexe Ag-Ac pourra alors être visualisé par l'ajout de peroxyde substrat de l'enzyme peroxydase et d'un donneur d'électron, le DAB (3-3', diaminobenzidine). La réaction donne alors, un produit coloré en brun.

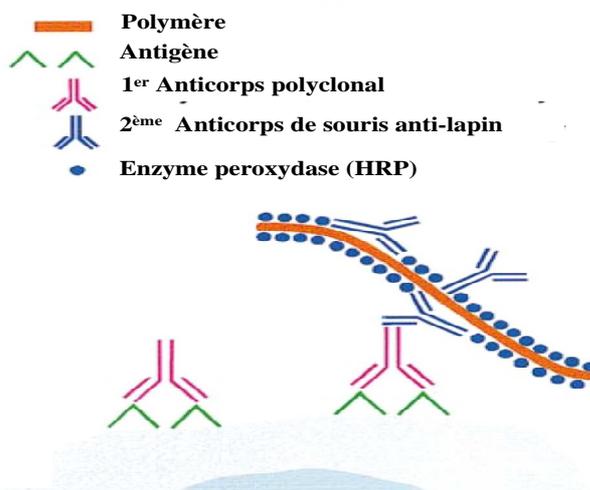


Figure 37 : Principe de la technique d'immunohistochimie (Werther et al., 1999).

Les lames sont laissées à sécher à température ambiante, puis fixées dans l'acétone froid à -20°C , ensuite elles sont rincées trois fois (5 min) dans du tampon Tris (TBS, 50mM, pH 7,6). Par la suite elles sont incubées avec le bloquant Peroxydase Block contenu dans le kit Novocastra pendant 20 minutes ce bloquant permet d'inhiber les peroxydases

endogènes. Après un rinçage (3x5 min) au tampon Tris, les sections sont incubées avec l'anticorps primaire le Ki-67 (dilution : 1/1000) pendant 1h30 à température ambiante dans un réceptacle humide. Après un lavage (3x5 min) au TBS Tween 1x le « Post Primary Block » est ajouté aux coupes pendant 30 minutes afin de bloquer les sites antigéniques non spécifiques. Les lames sont par la suite incubées avec le « Novolink Polymer » qui correspond à l'anticorps secondaire pendant 45 min. Le complexe antigène-anticorps est détecté suite à une incubation avec la DAB donnant un produit coloré en brun. Enfin les coupes sont soumises à une contre-coloration avec l'hématoxyline qui colore les noyaux en bleu. Des contrôles négatifs sont préparés en parallèle en remplaçant l'anticorps primaire par le diluant d'anticorps afin de s'assurer de la spécificité du marquage.

Le nombre de noyaux Ki-67 positifs est compté dans 30 champs par coupe (3 coupes/animal) grâce au microscope optique (Nikon Eclipse E 600) et à la caméra digitale (Nikon) relié au logiciel (NIKON DXM1200 c NIS-Eléments BR 3.0). Les résultats sont exprimés en nombre de noyaux marquées/mm².

6. Dosage ELISA de l'EGF sérique

La technique utilisée pour notre étude est l'ELISA en « sandwich ». Les premiers anticorps, appelés anticorps de capture, sont mis en incubation au fond des puits de la plaque ELISA ; les anticorps non fixés sont éliminés par lavage avec le tampon de lavage. Les puits sont ensuite remplis d'une solution de saturation qui agit comme un film protecteur et empêche toute fixation non spécifique ultérieure ; le surplus de cette solution est éliminé par des rinçages successifs. L'antigène à doser (sérum) est alors ajouté et se fixe aux anticorps. Les antigènes non fixés sont éliminés par des lavages successifs. Les complexes anticorps-antigènes formés sont détectés grâce à des anticorps secondaires couplés à une enzyme. L'antigène est donc pris en sandwich entre deux anticorps. Le surplus d'anticorps lié à l'enzyme est éliminé par rinçages successifs. Les complexes anticorps-antigènes-anticorps liés à l'enzyme sont révélés par l'ajout d'un substrat incolore dont les produits de dégradation sont colorés. La dégradation est stoppée par une solution adaptée et l'intensité de la coloration mesurée par la densité optique du puits est fonction de la quantité de substrats dégradée et donc de la quantité de « complexe sandwich » formée (Figure 38).

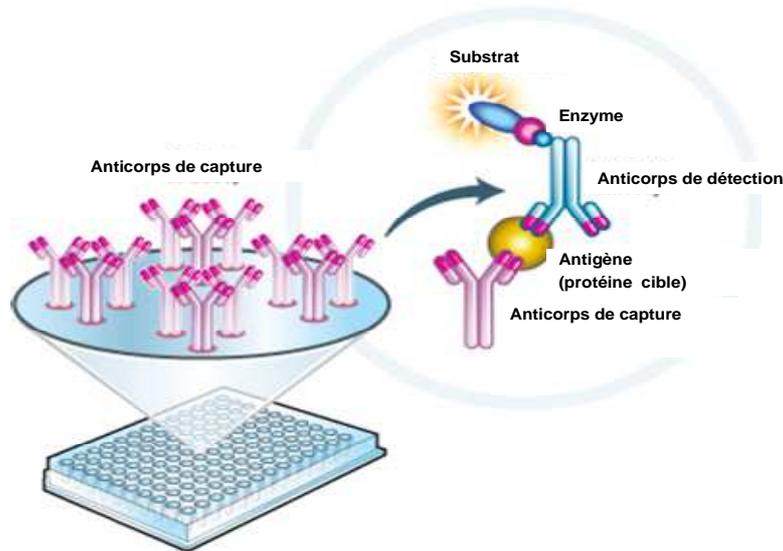


Figure 38 : Principe du test ELISA en « sandwich »

Brièvement en suivant les instructions du kit PeptoTech, nous avons rajouté 100 μ l d'anticorps de capture dans chaque puits d'une plaque ELISA. L'anticorps de capture est laissé pendant toute une nuit. Après quatre lavages successifs au tampon de lavage afin d'éliminer les anticorps non fixés ; on effectue une incubation d'1 heure à température ambiante avec un tampon de blocage. Après quatre lavages avec le tampon de lavage, 100 μ l de nos échantillons (sérums) et des solutions standards sont rajoutés : les solutions standards sont préparées préalablement en diluant la solution mère (1ng/ml>>>>>>0). Une fois les standards et les échantillons distribués dans les puits, on laisse incuber à température ambiante pendant 2 heures. Les quantités d'EGF non fixées sont éliminées par quatre lavages successifs. 100 μ l de la solution anticorps de détection sont rajoutés dans les puits et on incube à température ambiante pendant 2 heures afin de détecter l'EGF dans les sérums. Le surplus d'anticorps de détection est éliminé par lavage et on ajoute 100 μ l du complexe avidin-HRP conjugué. Après 30 min d'incubation à température ambiante le substrat ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), qui est un substrat initialement incolore mais qui, une fois rajouté au puits, donne une coloration verte. La plaque est ensuite placée dans le lecteur de plaque et lu à deux longueurs d'ondes : à 405nm et à 650nm le programme utilisé est une lecture en cinétique la plaque est lue avec un intervalle de 5 minutes pendant 20 minutes. Les résultats sont obtenus grâce à un logiciel relié au lecteur de plaque et les concentrations de l'EGF sont exprimées en pg/ml. Les étapes du dosage sont reprises dans l'annexe 2.

7. Expression des ARNm par PCR relative en temps réel

Les principales étapes de la PCR temps réel sont résumées dans la figure 39.

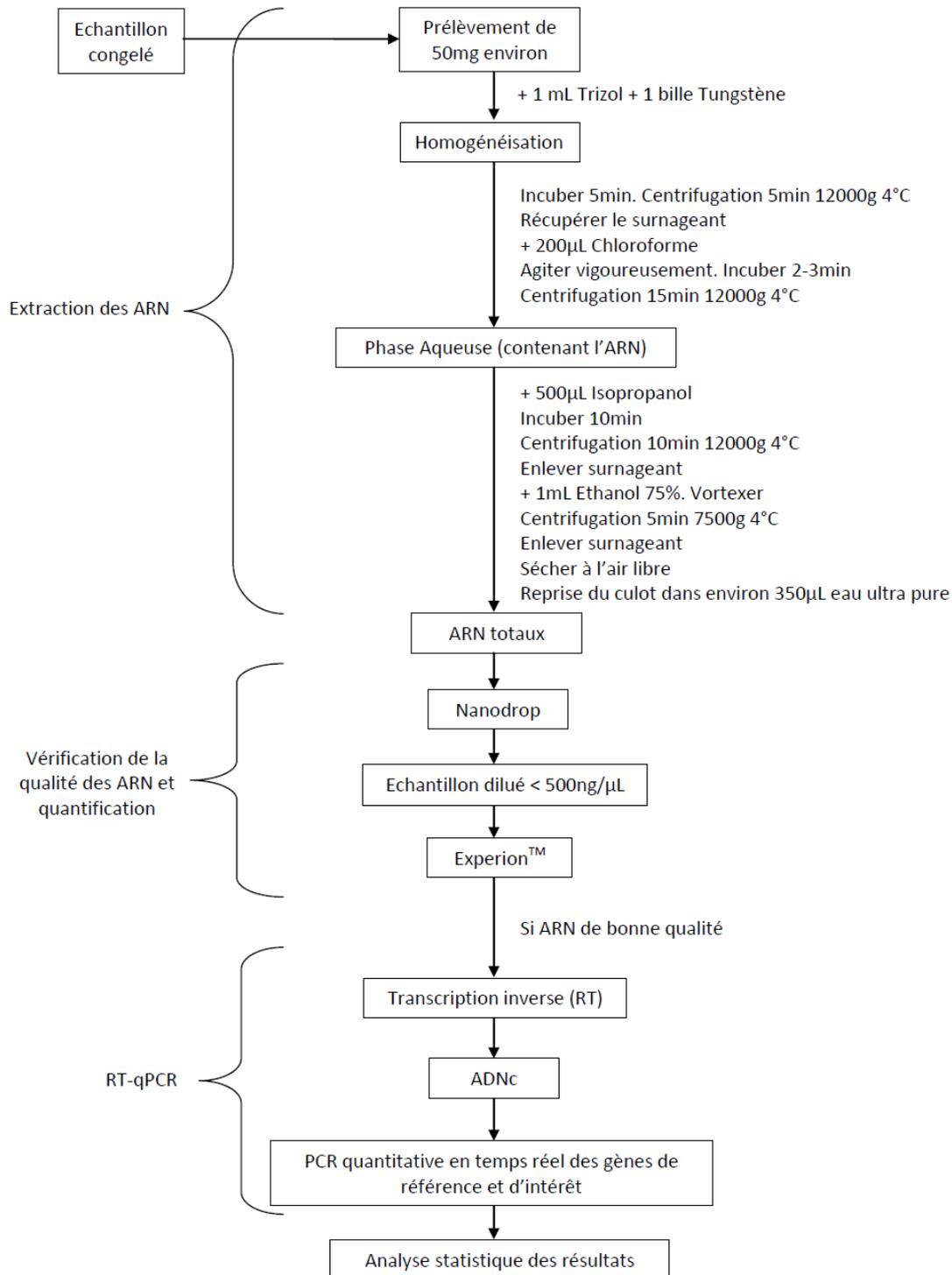


Figure 39: Protocole expérimental établi pour l'analyse de l'expression des ARNm des gènes étudiés dans les glandes submandibulaires de rats.

7.1. Extraction des ARN totaux

La glande encore congelée est coupée avec un scalpel : environ $\frac{1}{4}$ de la glande fournit une quantité d'ARN totaux suffisante pour les différentes analyses à effectuer. L'extraction est réalisée en ajoutant 1 ml de Trizol[®]. Ce réactif contient du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine : le phénol fixe l'ADN double brin et l'isothiocyanate de guanidine forme un complexe avec l'ARN (Bastard et al., 2002).

Après homogénéisation au Tissue Lyser, la préparation est laissée 5 min à température ambiante puis centrifugée 5 min à 1200g pour précipiter les débris. Le surnageant est prélevé et 0,2 ml de chloroforme sont ajoutés au surnageant récupéré. Après 3 min d'incubation à température ambiante, une nouvelle centrifugation (15 min, 1200g) permet d'obtenir trois phases : une phase organique qui contient les protéines et une phase aqueuse (phase supérieure) où se trouvent les ARN totaux, séparées par une interphase laiteuse contenant l'ADN.

La phase aqueuse est prélevée et les ARN totaux sont précipités par ajout d'isopropanol (0,4v/v) et 10 min d'incubation. Le culot d'ARN est obtenu par centrifugation (10 min, 12000g), est lavé deux fois avec 1 ml d'éthanol à 75% et une centrifugation (5 min, 7500g). Le culot propre est séché pendant 10 min (tube ouvert) puis repris par 35 à 80 μL H₂O BM selon sa taille. Les ARN totaux sont conservés à -80 °C pour une utilisation ultérieure et doivent être décongelés dans la glace.

7.2. Dosage et vérification de la bonne qualité des ARN totaux

La pureté et la quantité des ARN obtenus sont estimées par la mesure de l'absorption au spectrophotomètre NanoDrop[™]. La particularité et l'intérêt du NanoDrop[™] reposent sur sa capacité à mesurer l'absorbance sur une petite quantité d'échantillon (1 μL).

La limite inférieure de détection de l'appareil pour l'ARN est de 2 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, la limite supérieure de 3000 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Une dilution est nécessaire pour les échantillons qui dépassant cette concentration afin d'avoir des résultats corrects.

Les ARN totaux extraits sont lus à des densités optiques (DO) de 230, 260 et 280 nm. La DO à 260 nm correspond à l'absorbance des acides nucléiques et permet de quantifier les ARN sachant qu'une DO à 260 nm correspond à une concentration en ARN de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Celle à 230 nm correspond à l'absorbance des solvants (éthanol, chloroforme) tandis que les protéines absorbent à 280 nm. On en déduit les rapports $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{230}$ et $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$. Un extrait est de bonne qualité lorsque le rapport $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{230}$ est proche de 2,2 et que le rapport $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ est compris entre 1,8 et 2,1. Si l'on a une contamination, soit par le solvant, soit par des protéines, ces rapports vont diminuer.

La vérification et la quantification de l'ARN est réalisé grâce à l'Experion™. L'Experion™ est un appareil qui permet d'identifier par électrophorèse les ARN totaux par rapport à un marqueur et de vérifier s'ils sont de bonne qualité en déterminant le rapport 28S/18S correspondant aux ARN ribosomiaux, dont le rapport est idéalement proche de 1,8. En outre, cette méthode a l'avantage de n'utiliser qu'une petite quantité d'échantillon (1 µL) déposée sur une puce (Figure 40).



Figure 40 : Schéma d'une puce utilisée pour l'analyse de la qualité des ARN (www.bio-rad.com).

L'Experion™ nous donne la concentration en ARN totaux de notre échantillon, leurs puretés et leurs intégrités, et permet notamment de détecter une contamination par de l'ADN, en effet celui-ci absorbe également à 260 nm.

Le logiciel d'acquisition nous permet d'obtenir un électrophorégramme par échantillon et du ladder et un gel virtuel qui illustre l'état de la préparation (Figure 41).

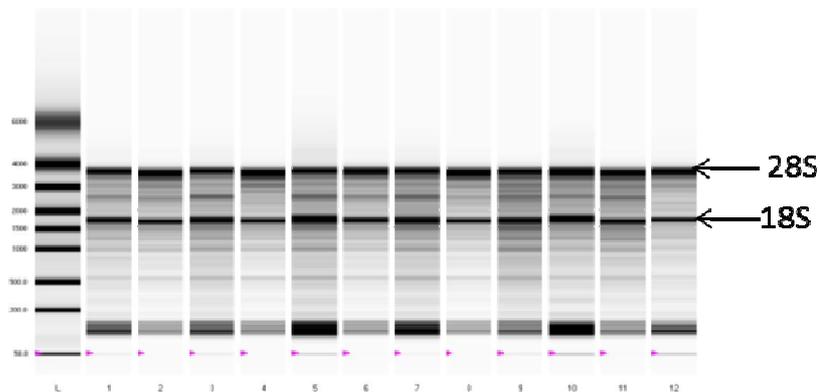


Figure 41 : Gel virtuel fourni par l'électrode automatisée de la puce de l'Experion™.

7.3. Traitement à la DNase

Afin d'éliminer d'éventuelles traces d'ADN, les échantillons d'ARN sont soumis à un traitement à la DNase. Pour cela, 2 µg d'ARN (16 µL) sont incubés avec 2 unités de DNase en solution dans un volume total de 20 µL de tampon Tris/HCl 40 mM pH 8 pendant 30 min à 37 °C puis la réaction est stoppée avec 2 µL d'EDTA 2 mM pH 8 durant 10 min à 65 °C.

7.4. Réaction de transcription inverse (RT)

Après traitement à la DNase, chaque échantillon est divisé en deux afin d'effectuer deux RT sur 1 µg d'ARN totaux de départ. A 11 µL de la solution d'ARN, on ajoute 4 µL du réactif « *i*Script reaction mix 5X », 1 µL du réactif « *i*Script Reverse transcriptase », et 4 µL de H₂O BM (volume final 20 µL). La réaction se fait dans le thermocycleur *icycler* (Biorad) pendant 5 min à 25 °C puis 30 min à 42 °C et 5 min à 85 °C. L'enzyme a une action RNase H qui détruit l'ARN matrice et une action ADN polymérase qui synthétise le brin complémentaire de l'ADNc. L'expression des ARNm est donc mesurée sur la base des ADNc correspondants qui subissent une amplification par PCR.

7.5. PCR relative en temps réel

Les réactions d'amplification sont effectuées avec thermocycleur *MyiQ* de BioRad (Marne-La-Coquette, France). Les séquences spécifiques des amorces pour les récepteurs stéroïdiens, les facteurs de croissance et les gènes exocrines de la glande SM sont indiquées dans le Tableau V. Toutes les amorces ont été synthétisées par Eurobio (Les Ulis, France). Les séquences ont été dessinées par le logiciel *Beacon Designer 4.0* (Bio-Rad, Marne-La-Coquette, France). L'expression sera estimée par comparaison à l'expression des ARNm d'un gène de référence, en l'occurrence le RPS9 (ribosomal protéine S9), gène exprimé dans toutes les cellules.

Tableau V : Séquences des paires d'amorces oligonucléotidiques utilisées

Gènes	Séquences (sens et anti-sens)	Taille de l'amplicon (pb)	Température d'hybridation
RPS9	5'- GCA AGC AGG TGG TGA ACA TTC C- 3' 5'- CCA TAA GGA GAA CGG AGG GAG AAG- 3'	85	60
ERα	5'-TCC AGC AGC AGC GAG AAG G- 3' 5'-GTC GTT ACA CAC AGC ACA GTA GC- 3'	75	60
ERβ	5'-GAGGCAGAAAAGTAGCCGGAA- 3' 5'-CGTGAGAAAGAAGCATCAGGA- 3'	94	57
AR	5'-ACC ATA TCT GAC AGT GCC AAG GAG - 3' 5'-TCC AGT GCT TCC ACA CCC AAC- 3'	74	60
PR	5'-TGG TCT AAG TCT CTG CCA GGT TTC- 3' 5'-TGA CAA CTC CTT CAT CCT CTG CTC - 3'	186	60
EGF	5'-TTG AAA GGA TTT GCT GGC GAT GG- 3' 5'-TGG ACG AGG TGG GAG GAC GG- 3'	88	60
TGFα	5'-TCA CAG CAG CCA GTA CCA TCC - 3' 5'-ATG TCC AAC CAG ATT TGC CTC AAC - 3'	139	60
NGF	5'-TGA TCG GCG TAC AGG CAG AAC- 3' 5'-GCG GAG GGC TGT GTC AAG G- 3'	110	60
AC VI ou (Gustine)	5' GAGAAGGGATGTGGGTGAGA 3' 5' GGAGGTTCCGGGGTGATTTAT 3'	212	60
Mucine 10 (Muc10)	5' GCCAAAACCACATCCATACC 3' 5' TATATCCTGGAGGGCAGACG 3'	191	60
Cystatine C	5' TGGTGAGAGCTCGTAAGCAG 3' 5' TTGCAGCTGGATTTGTGTCAG 3'	208	60

La PCR temps réel utilise un marqueur fluorescent, le SYBR Green I, qui s'intercale dans l'ADN double brin et excité par les UV, fluoresce. Il permet donc de suivre en temps réel l'amplification du gène (Poitras et al., 2002).

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

La PCR temps réel se fait en plusieurs phases :

- une phase d'initiation au cours de laquelle la fluorescence est très faible et stable : il s'agit du bruit de fond de la fluorescence qui définit la ligne de base.

- une phase exponentielle qui correspond à l'étape active d'amplification. A sa base se trouve la ligne seuil. C'est la valeur constante, pour laquelle la fluorescence mesurée n'est plus du bruit de fond. Elle est fixée par l'opérateur ou automatiquement par le logiciel. Elle correspond donc au début de la phase exponentielle d'amplification.

Le Ct (ou cycle seuil) est le point de croisement entre le seuil et la courbe expérimentale. C'est l'unité de valeur mesurée en temps réel.

- une phase de plateau qui correspond à un ralentissement de l'amplification qui peut être dû à un épuisement des réactifs notamment les amorces.

L'indicateur fluorescent permet aussi de déterminer une courbe de fusion. Elle découle de la diminution de la fluorescence observée lorsque l'ADN double brin se dénature quand la température augmente. Elle comporte trois étapes : une dénaturation rapide à 95 °C, suivie d'une réhybridation par refroidissement à 55 °C puis la température est incrémentée de 0,5°C jusqu'à 95 °C. A cette étape, la fluorescence est de nouveau mesurée de façon continue. La courbe de fusion peut être représentée sous forme de dérivée première de la diminution de fluorescence par rapport à la température (Figure 42).

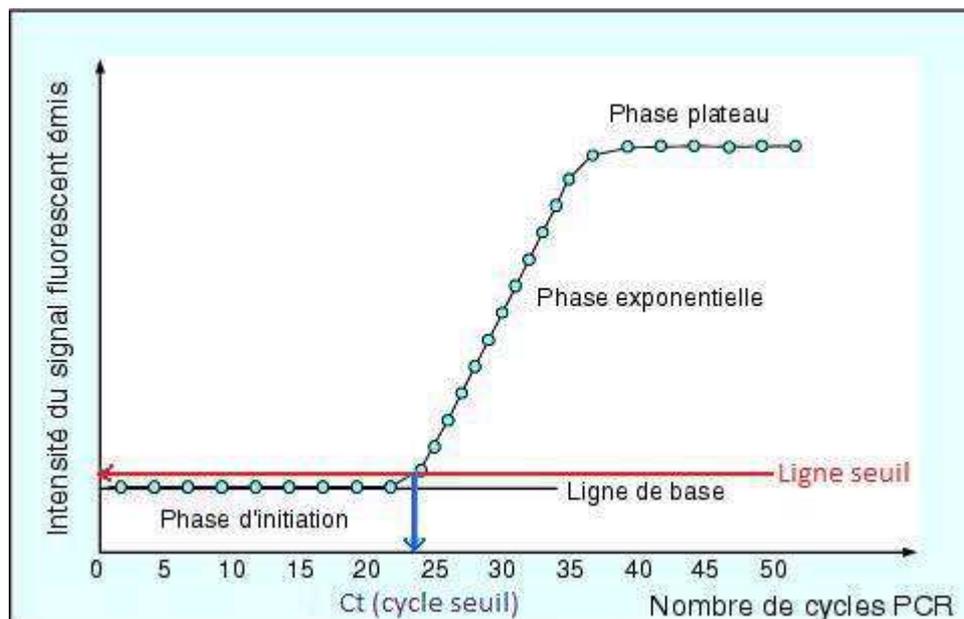


Figure 42 : Courbe théorique de l'intensité du signal émis en fonction du nombre de cycles lors d'une PCR en temps réel (source: www.jle.com).

Selon le nombre d'échantillons, la réaction se fait soit en plaque 96 puits, soit en barrette de 8 puits. Tous les échantillons sont effectués en double.

Pour un volume réactionnel final de 25 µL, 12,5 µL de « supermix », 1 µL d'amorce sens et 1 µL d'amorce anti-sens (0,4 µM en concentration finale) et 5,5 µL H₂O sont ajoutés à 5 µL d'ADNc à analyser (soit 50 ng d'ARN totaux).

Remarque : Le supermix contient la Taq Polymérase (50 U/mL) et le tampon correspondant (100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,4), les dNTP (0,4 mM de chaque) du 6 mM MgCl₂, 6 mM du SYBR Green I, 20 nM et de la fluorescéine : marqueur passif non influencé par l'amplification de fluorescence constante qui corrige les différences de lecture.

Sous une enceinte PCR, afin d'éviter toute contamination, on prépare un « mix », en pratique il correspond au nombre d'échantillons +1 ou +2 et contient le « supermix » et les amorces. Puis ce « mix » est distribué (20 µL) dans chaque puits de la plaque ou de la barrette. Lors de la manipulation, la plaque est mise dans un bloc réfrigérant, les amorces et le « supermix » sont décongelés et conservés dans la glace. Toutes les solutions doivent être homogénéisées et centrifugées brièvement avant leur utilisation. On met un film sur la plaque qui est ensuite centrifugée à 1500 tours/min quelques secondes. L'ADN est ensuite déposé à raison de 5 µL par puits. Un témoin sans ADN mais contenant 5 µL d'H₂O sert de témoin de non contamination de la PCR. La plaque est placée dans le thermocycleur, le programme est dans le tableau VI.

Tableau VI : Programme de la PCR temps réel

Cycle	Température	Durée	Incrémentation	Répétition	Etape
Cycle 1	95°C	3min	0	X1	Activation Hot Start
Cycle 2	95°C	10s	0	X40	Dénaturation hybridation élongation
	60°C	30s	0		
Cycle 3	95°C	60s	0	X1	dénaturation rapide
Cycle 4	55°C	60s	0	X1	réhybridation
Cycle 5	55°C	10s	0,5	X81	Incrémentation

La quantification du nombre d'amplicons formées est réalisée à l'aide de courbes standard obtenues à partir de dilutions successives d'ADNc, purifié de la glande SM. Ces courbes standard sont analysées grâce au logiciel iQ5 de Bio-Rad.

7.6. Analyse des gènes cible par le calcul de l'expression relative d'ARNm

L'expression des transcrits est calculé selon la méthode mathématique de Pfaffl (2001) qui est la suivante :

$$Ratio = (E_{cible})^{\Delta Ct_{cible}(contrôle-traité)} / (E_{réf})^{\Delta Ct_{réf}(contrôle-traité)}$$

E_{cible} est l'efficacité de la PCR temps réel du gène cible elle doit être entre (90 et 110%) ; E_{ref} est l'efficacité de la PCR temps réel du gène de référence (RPS9 dans notre étude).

Ct est le cycle seuil qui est le nombre de cycles requis au signal fluorescent pour franchir le seuil.

$\Delta Ct_{\text{cible}} = Ct \text{ du contrôle} - Ct \text{ du traité pour la transcription du gène cible}$; $\Delta Ct_{\text{ref}} = Ct \text{ du contrôle} - Ct \text{ du traité pour la transcription du gène référence}$.

8. Analyse statistique

Toutes les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart type. L'analyse statistique des différences obtenues entre les valeurs observées chez les groupes traités et le groupe témoins a été effectuée par une analyse de variance (ANOVA) suivie par un post test de comparaison multiple des moyennes (test de Tukey). Le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de Mann-Whitney a été effectué pour analyser les résultats du test de préférence au sucré. Le seuil minimum de significativité retenu est $p < 0.05$. Le logiciel utilisé est SPSS PASW® Statistics 18 (SPSS Inc, Chicago, USA).

RESULTATS

1. Etude 1 : Effet d'une exposition précoce (gestation-lactation)

Les perturbateurs endocriniens peuvent agir différemment selon l'âge et l'exposition *in utero* est de loin la plus critique. Le signal hormonal manquant à un stade précis du développement peut perturber la formation des organes et entraîner des conséquences graves tout au long de la vie de l'organisme.

L'alimentation apporte simultanément de faibles doses de PE sous forme de phytoestrogènes (soja et dérivés) et de xénohormones (résidus de pesticides, contaminants...), ce qui soulève la question des effets, à terme, sur les organes sensibles aux hormones des enfants exposés via leur mère pendant la grossesse et/ou la lactation. On sait qu'une telle exposition peut influencer les préférences gustatives, mais la question d'un lien avec un éventuel effet sur les glandes salivaires n'a encore jamais été posée.

Parce que la littérature fait état, d'une part, de l'action des oestrogènes et des androgènes dans la mise en place des préférences gustatives, notamment au goût sucré, au cours de la période utérine, et d'autre part, des effets d'expositions prénatales de pesticides dotés de propriétés estrogéniques ou anti-androgéniques sur la préférence au sucré chez le jeune mâle (Flynn et al 2004, Ferguson et al 2005), nous avons essayé de relier les effets sur les glandes salivaires à des effets sur les préférences au sucré. En raison du dimorphisme sexuel décrit tant pour les préférences gustatives que pour les glandes salivaires, cette étude a été réalisée chez la femelle et chez le mâle à différents stades de développement.

Cette étude d'exposition précoce à la génistéine et/ou à la vinclozoline vise à définir les effets sur la glande submandibulaire de rats mâles et femelles à différents stades du développement et aussi à corrélés ces effets à ceux observés par les équipes partenaires sur d'autres organes. C'est pourquoi les effets ont été spécifiquement observés aux mêmes stades de développement que ceux définis par les équipes partenaires :

- Les stades mâles choisis sont le stade immature J25 et le stade adulte J100 pour lesquels on observe des altérations de l'appareil reproducteur mâle dans les mêmes conditions (Eustache et al., 2009).

- Les stades femelles choisis pour notre étude sont le stade immature J35 et le stade adulte J50 pour lesquels on observe aussi des altérations de la glande mammaire dans les mêmes conditions (El Sheikh Saad et al., 2011).

1.1. Effets chez des rats mâles au stade immature (J25) et adultes (J100)

1.1.1. Effet sur la préférence au sucré et sur le développement des glandes submandibulaires (Publication 1):

Ce volet de l'étude concernant les effets de l'exposition précoce sur les préférences au sucré et sur le développement des glandes salivaires ont été validés par une publication. Afin de relier ces effets à des effets neuroendocriniens sur le développement, nous avons également relevés différents paramètres associés au développement et au comportement alimentaire. Ces résultats ont été consignés dans la publication ci-jointe, acceptée dans le journal « Oral Diseases », et dont les illustrations graphiques sont commentées ci-après.

“Perinatal exposure to xenoestrogens impacts sweet preference and submandibular development in male rats”

Wided Kouidhi, Raymond Bergès, Céline Tiffon, Catherine Desmetz, Jean-Pierre Cravedi, Michèle El May, Jacques Auger et Marie Chantal Canivenc-Lavier.

Soumise à *Oral Diseases* le 5 Sept 2012

Acceptée pour publication après révisions mineures le 29 septembre 2012

ORAL DISEASES



Perinatal exposure to xenoestrogens impacts sweet preference and submandibular development in male rats

Journal:	Oral Diseases
Manuscript ID:	ODI-09-12-OM-2690
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	05-Sep-2012
Complete List of Authors:	Kouidhi, Wided; INRA, UMR1324 CSGA ; Faculty of Medicine Tunis, Research Unit n° 01/UR/08-07 Bergès, Raymond; INRA, UMR1324 CSGA Tiffon, Céline; INRA, UMR1324 CSGA Desmetz, Catherine; INRA, UMR1324 CSGA Auger, Jacques; Hôpital Cochin, 3Service d'Histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction et CECOS El May, Michèle; Faculty of Medicine Tunis, Research Unit n° 01/UR/08-07 Canivenc-Lavier, Marie Chantal; INRA , UMR1324 CSGA
Keywords:	Public Health, Biochemistry/physiology, Pathology

1 Perinatal exposure to xenoestrogens impacts sweet preference and submandibular
2 development in male rats

3 Wided Kouidhi ^{1,2}, Raymond Bergès ², Céline Tiffon ², Catherine Desmetz ², Michèle El May ¹,
4 Jacques Auger ³, Marie Chantal Canivenc-Lavier ².

5 ¹ Research Unit n° 01/UR/08-07, Tunis El Manar University, Faculty of Medicine Tunis,
6 15 rue Djebel Lakhdar, Tunis 1007, Tunisia.

7 ² INRA, UMR1324 CSGA - 17 Rue Sully - BP 86 510 - 21065 Dijon-cedex, France.

8 ³ Service d'Histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction et CECOS,
9 Hôpital Cochin, 75014 Paris, France.

10
11 Running title: Submandibular gland as endocrine target

12
13
14 Corresponding author: Marie Chantal Canivenc-Lavier
15 Centre des Sciences du Gout et de l'Alimentation
16 UMR1324, INRA, 17 Rue Sully,
17 BP 86 510 - 21065 Dijon cedex. France
18 Tel: 33 3 80 69 33 53
19 Fax: 33 3 80 69 32 25
20 E mail : Marie-Chantal.Canivenc@dijon.inra.fr

21

22

23

24

25

26

1
2
3 31 Abbreviations:
4

5 32 AGD, anogenital distance ; AR, androgen receptor ; CA VI, carbonic anhydrase 6; Ct, cycle
6

7 33 threshold; DNA, deoxyribonucleic acid; EDC, endocrine disruptor compound ; EGF, epidermal
8

9 34 growth factor ; ER, estrogen receptor ; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; GCT,
10

11 35 granular convoluted tubule ; GD, gestational day ; HPLC-DAD, high pressure liquid
12

13 36 chromatography-diode array detection ; LC-MS, liquid chromatography- mass spectrometry ;
14

15 37 NGF, nerve growth factor ; NOAEL, no observed adverse effect level ; PCB, polychlorinated
16

17 38 biphenyls, PCR, polymerase chain reaction ; PND, postnatal day ; PR, progesterone receptor ;
18

19 39 RNA, ribonucleic acid; RPS 9, ribosomal protein S9; SD, standard deviation; SPF, specific
20

21 40 pathogen free; SSG, submandibular salivary gland ; TGF α , transforming growth factor α
22

23
24
25 41
26

27
28 42
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

1
2
3 43 Abstract

4
5 44 OBJECTIVE : To determine the effect of perinatal exposure to low doses of genistein and/or
6
7 45 vinclozolin on submandibular salivary gland (SSG) development in juvenile and adult male rats
8
9 46 and to establish a link with a sweet preference.

10
11 47 MATERIELS AND METHODS: Female rats were orally treated (1mg/kg Body Weight/day) with
12
13 48 chemicals, alone or in combination, from the first gestational day up to weaning. Sweet preference
14
15 49 was assessed at weaning and adulthood in male offspring; submandibular glands were then
16
17 50 collected to study morphogenesis and mRNA expression of steroid receptors, growth factors and
18
19 51 taste related proteins.

20
21
22 52 RESULTS: Exposure to genistein and/or vinclozolin resulted in a higher saccharin intake at
23
24 53 postnatal day 25 ($P < 0.05$) linked to a higher number of pro-acinar cells ($P < 0.01$) and mRNA
25
26 54 expression of progesterone receptor, growth factors and gustine ($P < 0.01$). These increases
27
28 55 disappeared at adulthood, but mRNA expression of sex hormone receptors and growth factors were
29
30 56 similarly repressed in all treated groups ($P < 0.01$).

31
32 57 CONCLUSION: Our findings confirm that SSG are target of xeno-hormones and provide
33
34 58 evidence that a perinatal exposure to low doses of genistein and/or vinclozolin could
35
36 59 simultaneously disrupt salivary gland prepubertal development and sweet intake but also
37
38 60 endocrine gene mRNA expression later in life.
39
40

41
42
43 61

44
45 62 Keywords: endocrine disruptor, phytoestrogen, dietary exposure, salivary glands, morphogenesis,
46
47 63 growth factors, saccharine intake.
48
49

1
2
3 65 Introduction
4

5 66 Endocrine disrupting compounds (EDCs) are chemicals that are natural or produced by industrial
6
7 67 processes and leak into the environment and hence enter the food chain. They may interfere with
8
9 68 the body endocrine system and produce adverse developmental, reproductive, neurological, and
10
11 69 immune effects in both humans and wildlife. Interestingly in the literature feeding behaviour and
12
13 70 sensory perceptions are also concerned: sex differences in sweet and salty preferences are related
14
15 71 to the influence of estrogens and androgens, but also progesterone and changes in sweet and salt
16
17 72 intakes during menstrual cycle and pregnancy are well documented (Duffy et al, 1998; Frye et al,
18
19 73 1994; Prutkin et al, 2000). Differences between males and females in food intake have been also
20
21 74 reported in rodents (Tattelin et al, 1971; Zucker et al, 1972) and several studies showed the effects
22
23 75 of EDC exposure on eating behaviour and taste preferences. Early exposure to estrogen-like
24
25 76 chemicals generally induced behavioural feminization of male. For example, a greater sweet
26
27 77 preference was reported in adult male rats perinatal treated with a PCB mixture (Hany et al, 1999)
28
29 78 or with bisphenol A (Xu et al, 2011), whereas the dietary genistein did not induce sweet
30
31 79 preference (Flynn et al, 2000). Interestingly, higher saccharin consumption was also observed in
32
33 80 males prenatally exposed to anti-androgenic chemicals such as vinclozolin, (Flynn et al, 2001) or
34
35 81 prochloraz (Vinggaard et al, 2005).
36
37
38
39
40 82 Salivary glands, through their exocrine and endocrine secretions, are involved in the maintain of
41
42 83 oral homeostasis, including taste perception. Thus, defects in salivary gland secretions can
43
44 84 predispose to oral disease and are often coupled with hypoguesia (Tanaka et al, 2002). Saliva plays
45
46 85 an important role in taste and food perception through the role of proteins (proteases) and growth
47
48
49

1
2
3 90 loss of fungiform taste buds, and this effect could be reversed by introducing EGF in drinking
4
5 91 water, whereas TGF alpha did not reverse it (Morris-Wiman et al, 2000).
6

7 92 Partial or total xerostomia can occur as a consequence of drug intake, aging, or several pathologies
8
9 93 (diabetes mellitus, hypertension, neurological disorders, depression). We have recently reported
10
11 94 that exposure to low doses of estrogenic soy-isoflavone genistein and/or anti-androgenic food
12
13 95 contaminant vinclozolin can also alter the development of female submandibular salivary glands
14
15
16 96 (Kouidhi et al, 2012).
17

18 97 In the present study we report the effects on the development of male rat SSG of in utero and
19
20 98 lactation oral exposure to non-pharmacologic doses of two reference sex-hormone-like disruptors,
21
22 99 genistein, an estrogenic isoflavone present in mammalian diets, and vinclozolin, an anti-androgenic
23
24
25 100 chemical commonly found in food commodities of plant origin (EFSA, 2010). This study aimed to
26
27 101 identify a linkage between an effect of gestational and lactational exposure to genistein and/or
28
29 102 vinclozolin on saccharin intake (Bergès et al, 2008) with an effect on the structure and function of
30
31 103 SSG in male rats at immature stage (PND25) and later in life (PND 100).
32
33

34 104

35
36 105
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

1
2
3 106 Materials and Methods

4
5 107

6
7 108 Chemicals

8
9 109 Genistein was synthesized with a purity of 99% (LCOO, Université Bordeaux 1, Talence, France).

10
11 110 Vinclozolin was extracted from the commercial formulation Ronilan (BASF, Levallois-Perret,

12
13 111 France) according to Bursztyka et al, (2008). The extract was dried in vacuo, and then

14
15 112 recrystallized from methanol. Its purity, as verified by HPLC-DAD (from 192 to 400 nm) and GC-

16
17 113 MS analysis, was higher than 96% (data not shown). In addition, the absence of the degradation

18
19 114 products M1 and M2 was verified by LC-MS.

20
21 115

22
23
24 116 Animals and experimental procedures

25
26 117 All procedures involving rats were approved by the local authorities according to the French

27
28 118 Ministry of Agriculture ethical guidelines for care and use of laboratory animals and Good

29
30 119 Laboratory Practices . The animals of our study were from the same pool of animals than those

31
32 120 studied in recent reports of Kouidhi et al (2012) and El Sheikh Saad et al (2011): the present study

33
34 121 was part of a larger study aiming at investigating the effects of low doses genistein and/or

35
36 122 vinclozolin on the development and or function of several hormonally regulated organs or tissues.

37
38 123 A total of 60 specific-pathogen-free (SPF) female and 60 SPF male Wistar Han rats at 8 weeks of

39
40 124 age (Harlan France Sarl; Gannat, France) were acclimatized to SPF housing conditions (22°C room

41
42 125 temperature with 55% relative humidity and a 12-hr light/dark period) for 4 weeks before mating.

43
44 126 To avoid xeno-hormone residues, they were housed in individual polypropylene cages and were

45
46
47
48
49

1
2
3 131 randomly allocated to four groups corresponding to control (CTRL), genistein (GEN), vinclozolin
4
5 132 (VIN) and genistein/vinclozolin (GEN+VIN) groups (15 rats/group). On parturition day, the litters
6
7 133 were weighed, sexed and standardized at ten offspring. From GD1 to weaning (PND 21), dams
8
9 134 daily received the xeno-hormones at a 1mg/kg BW oral dose, alone or in combination. Genistein
10
11 135 and/or vinclozolin were dissolved in corn oil (Carrefour, Dijon, France) in order to give 2 mL/kg
12
13 136 body weight. Control animals received the same volume of vehicle alone (2 mL/kg body weight).
14
15
16 137 To prevent photolysis and oxidation, solutions were stored at 4°C in closed vials wrapped in
17
18 138 aluminium foil.

19
20
21 139 At weaning, male offsprings were marked with implanted chips, and rats from independent litter
22
23 140 were gathered in polypropylene cages (four per cage). They had ad libitum access to charcoal-
24
25 141 filtered water and were fed the same soy-free purified diet until sacrifice on PND 25 or PND 100.
26
27 142 Body weight and food consumption were measured twice a week. Concomitantly, the anogenital
28
29 143 distance (AGD) - a well-known sensitive endpoint for estrogenic and anti-androgenic chemical
30
31 144 compounds - was measured at weaning (PND 21) by considering up to 3 males per litter (n =
32
33 145 40/group). For each litter, AGD was averaged to consider the litter as the unit.

34
35
36 146 Sixteen males per group were randomly designed for salivary glands removing at prepubertal
37
38 147 (PND 25; n=10) and adult (PND100; n=10) ages. Simultaneously, twelve males per group were
39
40 148 randomized to evaluate sweet preferences at the same time (PND 21 and PND 88).

41
42
43 149

44
45 150 Sweet preference test

46
47 151 Three days before testing, rats were housed individually in propylene cages and two 250 mL
48
49

1
2
3 156 bottles was switched every day to prevent position preference. Saccharin and water consumption
4
5 157 was measured daily at the beginning of the day by weighing the bottles. The preference ratio was
6
7 158 calculated as the ratio of tastant drinking to the total liquid drinking.
8

9
10 159

11
12 160 Sacrifice and sampling

13
14 161 Respectively at PND 25, and PND 100 male pups were anesthetized with isoflurane (2.5%)
15
16 162 followed by rib cage opening and dorsal aorta exsanguination. SSGs were carefully excised, then
17
18 163 weighed. The left SSG was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further
19
20 164 mRNA analysis. The right SSG was embedded in O.C.T.™ compound (Sakura Finetek, France),
21
22 165 frozen (-56 to -62°C) in an isopentane histobath (Thermo/Shandon Histobath, Cergy Pontoise,
23
24 166 France), then stored at -80°C for further histological analysis.
25
26

27 167

28
29
30 168 Quantitative histological study

31
32 169 Five micrometres longitudinal sections of the whole SSG were cut with a Leica CM3050S Cryostat
33
34 170 (Leica, France) at -20°C. Slides were air-dried and stored at -80°C until analysis.

35
36 171 For histological analysis, cryosections were fixed for 10 seconds in RapidFix™ (Thermo Shandon,
37
38 172 France) and stained with Masson Trichrome. Slides were examined with a Nikon Eclipse 600
39
40 173 microscope with an attached DXM1200C camera (Nikon, Version 5.03). Microscopic images were
41
42 174 captured using a x40 objective (area = 0.0285 mm²) and analysed using imaging software NIS-
43
44 175 Elements Br 3.0 (Nikon, France). The number of pro-acini and area of striated ducts at PND 25 and
45
46 176 the number and the area of GCT at PND 100 were determined on 30 fields per animal (6 animals
47
48
49

1
2
3 181 RNA isolation and quantitative real-time PCR

4
5 182 The mRNA expression of SGG sex-hormone receptors (ER α , AR, PR) and growth factors (EGF,

6
7 183 NGF, TGF α) was measured by quantitative real-time PCR. Total RNA was extracted from SSG

8
9 184 using the TRIzol® Reagent (Invitrogen, France). The concentration and the integrity of total RNA

10
11 185 were assessed with the Experion™ system (BioRad, France). cDNAs were synthesized using the

12
13 186 iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) using 50 ng total mRNA. The Ribosomal Protein S9 was

14
15 187 used as internal control. Primer sequences and qRT-PCR conditions are listed in Table 1. All

16
17 188 oligonucleotide primers were designed using the Beacon Designer 4 software. Amplification and

18
19 189 detection of targeted and housekeeping genes were performed in duplicate for each animal (ten per

20
21 190 group) using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, France) on an iCycler MyiQ Single Color Real-

22
23 191 Time Detection System (BioRad, France). The PCR programme consisted of an initial denaturation

24
25 192 at 95°C for 30s, followed by 40 PCR cycles: 95°C for 5s, then 60°C for 10s. Amplification of

26
27 193 specific transcripts was confirmed by melting-curve profiles generated at the end of the PCR

28
29 194 program between 65 and 95°C. The relative expression of transcripts was based on the following

30
31 195 formula (Pfaffl, 2001):

32
33
34
35
36 196
$$\text{Ratio} = \left[\frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{t target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{t ref}}(\text{control} - \text{sample})}} \right],$$

37
38 197 where E_{target} is the real-time PCR efficiency of a target gene transcript (90-110%); E_{ref} is the real-

39
40 198 time PCR efficiency of the reference gene transcript; C_{t} : cycle threshold is the number of cycles

41
42 199 required for the fluorescent signal to cross the threshold; $\Delta C_{\text{t target}}$ is the C_{t} deviation of the control

43
44 200 – sample for the target gene transcript and $\Delta C_{\text{t ref}} = C_{\text{t}}$ deviation of control – sample for the

45
46
47 201 reference gene transcript.

1
2
3 206 Statistical analysis

4
5 207 For each group, the data were expressed as mean \pm SD. All the pups were observed per litter and
6
7 208 per group whereas SSG data were averaged considering the number of rats randomly selected per
8
9 209 group for each sacrifice. Statistical analyses were run using the SPSS version 12.0 statistical
10
11 210 packages (SPSS[®] Inc., Chicago, IL, USA). Significant differences in sweet preference were
12
13 211 evaluated using the non parametric Kruskal Wallis test and means of each group were compared by
14
15 212 pairs using Man-Whitney U test. Significant differences for morphometric study and PCR data
16
17 213 were determined using standard one-way ANOVA. When appropriate, inter-group comparisons
18
19 214 were performed using post hoc Tukey's test. A P-value ≤ 0.05 was considered statistically
20
21 215 significant. However, due to the relatively small size of the groups for some aspects of the study, a
22
23 216 significance level of 0.10 was occasionally mentioned in the Results section.
24
25
26

27 217

28
29
30 218 Results

31
32 219 Effect on food consumption, growth rate and development

33
34 220 Daily exposure to 1mg/kg BW of genistein and/or vinclozolin during the gestation/lactation period
35
36 221 did not affect food and water intakes of dams and offspring (data not shown). These exposures had
37
38 222 also no significant effect on the litter size, the sex ratio and the pup body weight at birth (Table2).
39
40 223 The onset of puberty was evaluated by considering the day of prepuce separation, and only a delay
41
42 224 tendency in the date of separation of the foreskin was observed in all treated group ($P < 0.1$). Only
43
44 225 the relative AGD was different among the four exposure treatments ($F = 2.99$, $P < 0.05$): VIN
45
46 226 significantly increased the relative AGD in comparison to GEN group (+ 10.15 %; $P < 0.05$)
47
48
49

1
2
3 231 Sweet preference test

4
5 232 As illustrated in Figure 1a, exposed males at PND 25 consumed a higher absolute volume of
6
7 233 saccharin solution compared to CTRL group (Kruskal-Wallis test indicated $P < 0.05$). In fact the
8
9 234 saccharin intake was increased by GEN (+111.22 %; $P < 0.05$) as well by VIN (+126 %; $P < 0.05$)
10
11 235 and by GEN+VIN mixture (+175.44%; $P < 0.05$). This saccharin over consumption was
12
13 236 compensated by a significant lower water drinking in all treated groups ($P < 0.05$ GEN (-81%),
14
15 237 VIN (-78%), GEN+VIN (-88%) vs. CTRL) (Figure 1b). Consequently, the sweet preference that
16
17 238 was 70% in CTRL group, increased to more than 90% in all treated groups (Figure 1c; $P < 0.05$).
18
19 239 At the adulthood a decrease in total drinking (saccharin + water intakes) was seen (Figure 2a-b) but
20
21 240 an increase in sweet preference (90%) was observed in CTRL group comparing to the immature
22
23 241 age, with no significant differences between treated and control groups (Figure 2c).

24
25
26
27 242
28 243
29 244 SSG morphometry

30 245
31 246 Effects of treatment on SSG morphometry were evaluated by counting the secretory structures
32
33 247 observed on histological slides stained using Masson trichrome. At PND 25, typical immature SSG
34
35 248 structures were found in controls: sero-mucous acini were predominant, and only few embryonic
36
37 249 pro-acinar cells that are precursor of sero-mucous acini persisted; striated ducts that further
38
39 250 undergone the granular convoluted tubules (GCT), a specific segment of adult rodent SSG and
40
41 251 connective tissue were also well developed (Figure 3).

42
43
44
45 252 In PND 25 treated rats, the SSG showed a predominance of residual pro-acinar cells by comparing
46
47 253 to control rats (ANOVA; $F= 19.64$; $P < 0.01$). This predominance was more marked in the VIN
48
49

1
2
3 258 At PND100, the SSG from control rats showed the aspect of mature glands: sero-mucous acini
4
5 259 were distinctly formed, as well as GCTs whereas only few striated ducts were observed (Figure 5).
6
7 260 At this stage, no difference was noted in SSG of control and treated rats (Figure 5a-d). This was
8
9 261 confirmed by similar numbers (Figure 6a) and areas (Figure 6b) of GCTs.
10
11 262
12
13 263 mRNA expression of sex-hormone receptors and endocrine growth factors
14
15 264 We evaluated the mRNA expression of sex-hormone receptors as molecular biomarkers of SSG
16
17 265 sex hormone responsiveness and growth factors mRNA expression as molecular biomarkers of
18
19 266 SSG endocrine secretions involved in taste perception. At PND25, the SSG of control rats
20
21 267 expressed differently the sex-hormone receptors: AR was the most abundant transcript (Ct = 27) in
22
23 268 comparison to ER α (Ct = 31) and PR (Ct = 30). The levels of AR transcripts were affected by the
24
25 269 treatments (F = 2.547, P < 0.05) but not ER α ; AR expression was significantly higher in the
26
27 270 GEN+VIN group comparing to the controls (+16.73; P < 0.05) (Figure 7a). As a singularity, a
28
29 271 general increase in PR mRNA expression was observed in the three treated groups comparing to
30
31 272 the CTRL group (ANOVA; F = 4.45; P < 0.01), this increase being significant in GEN and
32
33 273 GEN+VIN groups (+66.22%; P < 0.05; +65.6%; P < 0.05 respectively) and in the VIN group
34
35 274 (+72.96%; P < 0.01) (Figure 7b).
36
37 275 In parallel, expression of the EGF growth factor transcripts was highly expressed in the SSG of the
38
39 276 unexposed animals (Ct = 25), whereas TGF α and NGF mRNAs were less expressed (Ct = 29 and
40
41 277 Ct = 30, respectively). The mean level of EGF expression was not significantly different in the four
42
43 278 groups (Figure 7d) whereas ANOVA showed significant differences in the expression of TGF α
44
45
46
47
48
49

1
2
3 282 exposed rats in comparison to controls (TGF α : +29%; P < 0.05 and NGF: +16.73%; P < 0.05)
4
5 283 (Figure 7e-f)
6
7 284 At PND100, ER α was not detected (Ct > 36) and only AR and PR were expressed in the SSG of
8
9 285 CTRL group animals (AR Ct = 29 and PR Ct = 28). Analysis of variance indicated a significant
10
11 286 difference in AR (F = 6.56; P < 0.01) and PR (F = 13.2; P < 0.01) expression. Post-hoc pairwise
12
13 287 test evidenced a significant decreasing of AR expression in GEN (-71%; P < 0.01), VIN (-50.4%;
14
15 288 P < 0.05) and on GEN+VIN (-69.1%; P < 0.01) groups comparing to CTRL (Figure 8a) as well a
16
17 289 significant decrease in relative expression of PR in all treated groups (Figure 8b) (GEN : -80%, P <
18
19 290 0.01 ; VIN : -75%, P < 0.01) et GEN+VIN (-80%, P < 0.01). At this age, the EGF growth factor
20
21 291 transcripts only were very well expressed in the SSG of the unexposed animals (Ct =19), TGF α
22
23 292 and NGF mRNAs being less expressed (Ct = 31 and Ct = 32 respectively). In treated rats, a general
24
25 293 decrease in growth factors mRNA expression was observed, and the EGF expression was
26
27 294 significantly different (F = 9.37; P < 0.01), as were the expression levels of TGF α (F = 8.73; P <
28
29 295 0.01). Post-hoc pairwise comparisons showed that both EGF and TGF α mRNA expressions were
30
31 296 strongly affected by GEN (EGF: -76.95%; P < 0.01; TGF α : -70.52%; P < 0.01), by VIN (EGF: -
32
33 297 64.1%; P < 0.01; TGF α : -53.68%; P < 0.01) and GEN+VIN (EGF: -59.74%; P < 0.01; TGF α : -
34
35 298 61.72%; P < 0.01) as well, and their lower expressions were similar in all treated groups (Figure
36
37 299 8c-d). In contrast no significant differences were observed on the expression of NGF (Figure 8e).
38
39
40
41
42
43 300
44
45 301 mRNA Expression of salivary proteins
46
47 302 Mucin 10, gustin also called Carbonic anhydrase 6 (CA VI), and cystatin C mRNA expressions
48
49

1
2
3 307 Expression of gustin was strongly increased by GEN alone (+118.8%, $P < 0.05$) or mixed with
4
5 308 VIN (+64%, $P < 0.05$) but not by treatment with VIN alone (Figure 9a). At the opposite, the
6
7 309 expression of cystatin C was strongly repressed by GEN (-57.2%, $P < 0.01$) and by VIN alone (-
8
9 310 54%, $P < 0.01$), whereas this decreasing was moderate in the group treated by the GEN+VIN
10
11 311 mixture (-38.7%, $P < 0.01$) (Figure 9b). The mRNA expression of mucin 10 was increased in GEN
12
13 312 group (+80.9%, $P < 0.05$) and similarly in VIN (+89.52%, $P < 0.05$) and GEN+VIN groups
14
15 313 (+85.7%, $P < 0.05$) (Figure 9c). These results were transitory because mRNA expression of all
16
17 314 these genes was not affected by any treatment in young adults (Figure 10)
18
19
20
21
22

23 316 Discussion

24
25 317 Our study shows that genistein and vinclozolin, alone or in combination, affect the development
26
27 318 and function of secreting submandibular salivary glands in male rats, just like we have previously
28
29 319 described in female rats (Kouidhi et al, 2012). Here is new evidence that the submandibular glands
30
31 320 are potential targets of endocrine disruptors; additionally, this finding suggests a link between
32
33 321 impairment of exocrine secretions and taste preferences.
34
35 322 The inducing effect of early exposure to vinclozolin in sweet preference has already been described
36
37 323 in rats (Flynn et al, 2001), and our work reveals the additive effect of genistein on the vinclozolin
38
39 324 effect on sweet preference and on the structure and function of secreting submandibular gland as
40
41 325 well. The stronger effects of the genistein and vinclozoline mixture are comparable to those
42
43 326 observed on male reproductive tract (Eustache et al, 2009), mammary gland (El Sheikh Saad et al,
44
45 327 2011) and the submandibular gland in the immature females (Kouidhi et al, 2012).
46
47
48
49

1
2
3 332 mucin 10 and gustin, and by a decrease in the expression of cystatin. Moreover, gustin seems more
4
5 333 sensitive to estrogenic effects than anti-androgenic effects, whereas cystatin C and mucin 10 show
6
7 334 the same sensitivity to all treatments.

8
9 335 As previously described in female rats, effects of genistein and vinclozolin on the secretory
10
11 336 structures consequently affect the secretory function of the salivary glands. Morphometric analysis
12
13 337 identified a targeted effect on acini at PND25, but not at adulthood. In treated rats, the persistence
14
15 338 of pro-acini structure (embryonic precursors of acini) at the immature age may reflect delayed
16
17 339 maturation that was suggested by the apparent tendency of delay of puberty (delay in the date of
18
19 340 separation of the foreskin). This delayed maturation of the gland reminds that observed in SMG in
20
21 341 immature male rats following exposure to 5-bromodeoxyuridine (Fukushima and Barka, 1976).
22
23 342 The pro-acini are mucous acini that produce high levels of mucin (Moreira et al, 1991); thus the
24
25 343 higher expression of mucin 10 in treated rats can be regarded as a consequence of a developmental
26
27 344 delay. The increase of gustin (CA VI) expression can be directly related to the increase of sweet
28
29 345 preference since low salivary CA VI concentrations are linked to a decrease in taste perception and
30
31 346 an increase in apoptosis of taste receptor cells in the circumvallate papilla taste buds (Henkin et al,
32
33 347 1999 a,b).

34
35 348 As previously described in immature female rats (Kouidhi et al, 2012), the action of EDC on
36
37 349 secretory structures affects both progesterone receptor and growth factor expressions, up to give
38
39 350 similar expression profiles. However, whereas a repression of these genes was observed in females
40
41 351 treated with vinclozolin, alone or in mixture, we observed an increase of the same genes in the
42
43 352 immature males, and this opposite observation reveals a sexual difference in the response to
44
45
46
47
48
49

1
2
3 357 At adulthood, the secretory structures observed in EDC treated males have reach the same
4
5 358 developmental state as in control rats: the GCTs are well developed and show no histological
6
7 359 abnormalities. Meanwhile, the expression of genes involved in taste, like in sweet preference, is
8
9 360 not affected by the treatments. Curiously, while treatments are suspended from weaning, the
10
11 361 expression of AR and PR receptor, as well as growth factors EGF and TGF α are uniformly
12
13 362 repressed in adults treated, regardless of the initial hormonal properties of genistein and
14
15 363 vinclozolin. Our results reflect a programming term in endocrine secretions of the salivary glands
16
17 364 resulting from an EDC exposure in the early stages of life. This observation is of a great
18
19 365 importance considering the physiological role of submandibular growth factors EGF and TGF α in
20
21 366 the maintain of oral homeostasis (Mathison, 1995) but also in the process of gametogenesis (Reyes
22
23 367 et al, 1995, Liu et al, 1994; Arcieri and Martinelli, 1977), and arguing the poorly understood role
24
25 368 of the salivary glands on growth and development (Li et al, 1983; Bodner et al, 1991).
26
27
28
29

30 369

31
32 370 In summary, an exposure during gestation and lactation causes retardation of the puberty which
33
34 371 delayed in parallel the development salivary gland of immature animals and these prepubertal
35
36 372 morphometric alterations of submandibular secretory structures coupled to a defect on exocrine
37
38 373 mRNA genes expressions disappear in adulthood. However, the expression of sex hormone
39
40 374 receptors and endocrine growth factors seems independent of histological changes at the
41
42 375 adulthood. Concerning the endocrine functions, they seem less connected to maturity and the
43
44 376 decrease of growth factors expression is more linked to the expression of the sex hormone
45
46 377 receptors, particularly progesterone receptor. So just as hormone receptors, they are weak but
47
48
49

1
2
3 382 real-life situations in humans. This finding is also relevant since the submandibular glands are the
4
5 383 major producer of two growth factors, namely EGF and NGF that are involved in cell
6
7 384 differentiation and proliferation of numerous physiological processes including buccal homeostasis
8
9 385 and sensory events. Thus, considering the effect of endocrine disruptors on both glandular structure
10
11 386 and mRNA expression of endocrine products of the submandibular salivary gland, our results
12
13 387 suggest that endocrine disruptors could lead to early salivary glands dysfunctions that may be
14
15 388 predictive of a later adulthood oral disturbance, opening a new field of investigation in oral
16
17 389 researches.
18

19
20
21 390

22
23 391 Conflict of interest

24
25 392 All authors declare no conflict of interest.
26

27 393

28
29
30 394 Funding

31
32 395 This work was supported by the French Programme on Endocrine Disruption (PNRPE; contract
33
34 396 MEDD CV 05147), the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research, INRA and
35
36 397 grants from the Burgundy regional government.
37

38 398

39
40
41 399 Acknowledgments

42
43 400 Thanks are due to Laurence Decocq, Partick Tassin and Luc Perepelkine for their technical
44
45 401 assistance in the animal facility at INRA Dijon, to Anne Hillenweck (INRA Toulouse) for
46
47 402 preparing and providing vinclozolin, to Claire Chabanet for statistical assistance, and to Pr. Y
48
49

1
2
3 407 References4
5 408 Arcieri RM and Martinelli C (1977). Influence of salivary glands extirpation on procreation in rats.6
7 409 Tohoku J Exp Med 121: 105-10.8
9 41010
11 411 Bergès R, Issanchou S and Canivenc-Lavier MC (2008). Xéno-hormone exposure during12
13 412 pregnancy and lactation modify sweet preference of male but not female offspring. *Appetite* 51:14
15 413 353.16
17 41418
19 415 Bodner L, Knyszynski A, Adler-Kunin S and Danon D (1991). The effect of selective desalivation20
21 416 on wound healing in mice. *Exp Gerontol* 26: 357-63.22
23 41724
25 418 Bonnans SR and Noble AC (1995). Interaction of salivary flow with temporal perception of26
27 419 sweetness, sourness, and fruitiness. *Physiology & behavior* 57: 569-74.28
29 42030
31 421 Bursztyka J, Debrauwer L, Perdu E, Jouanin I, Jaeg JP and Cravedi JP (2008). Biotransformation32
33 422 of vinclozolin in rat precision-cut liver slices: comparison with in vivo metabolic pattern. *J Agric*34
35 423 *Food Chem* 56: 4832-9.36
37 42438
39 425 Christensen CM, Brand JG and Malamud D (1987). Salivary changes in solution pH: a source of40
41 426 individual differences in sour taste perception. *Physiology & behavior* 40: 221-7.42
43 42744
45
46
47
48
49

- 1
2
3 432 Duffy VB, Bartoshuk LM, Striegel-Moore R and Rodin J (1998). Taste changes across pregnancy.
4
5 433 Annals of the New York Academy of Science 855: 805-9.
6
7 434
8
9 435 El Sheikh Saad H, Meduri G, Phrakonkham P, Berges R, Vacher S, Djallali M, Auger J, Canivenc-
10
11 436 Lavier MC and Perrot-Applanat M (2011). Abnormal peripubertal development of the rat
12
13 437 mammary gland following exposure in utero and during lactation to a mixture of genistein and the
14
15 438 food contaminant vinclozolin. *Reprod Toxicol* 32: 15-25.
16
17 439
18
19 440 Engelen L, de Wijk RA, Prinz JF, van der Bilt A and Bosman F (2003). The relation between
20
21 441 saliva flow after different stimulations and the perception of flavor and texture attributes in custard
22
23 442 desserts. *Physiology & behavior* 78: 165-9.
24
25 443
26
27 444 European Food Safety Authority E (2010). Annual Report on Pesticide Residues according to
28
29 445 Article 32 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal* 8: [442 pp.].
30
31 446
32
33 447 Eustache F, Mondon F, Canivenc-Lavier MC, Lesaffre C, Fulla Y, Berges R, Cravedi JP, Vaiman
34
35 448 D and Auger J (2009). Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin
36
37 449 modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environ Health Perspect* 117:
38
39 450 1272-9.
40
41 451
42
43 452 Flynn KM, Delclos KB, Newbold RR and Ferguson SA (2001). Behavioral responses of rats
44
45
46
47
48
49

1
2
3 457

4
5 458 Froehlich DA, Pangborn RM and Whitaker JR (1987). The effect of oral stimulation on human

6
7 459 parotid salivary flow rate and alpha-amylase secretion. *Physiology & behavior* 41: 209-17.

8
9 460

10
11 461 Frye CA, Crystal S, Ward KD and Kanarek RB (1994). Menstrual cycle and dietary restraint

12
13 462 influence taste preferences in young women. *Physiology & behavior* 55: 561-7.

14
15 463

16
17 464 Fukushima M and Barka T (1976). The effects of 5-bromodeoxyuridine and isoproterenol on the

18
19 465 postnatal differentiation of rat submandibular gland. *Am J Anat* 147: 159-82.

20
21 466

22
23 467 Hany J, Lilienthal H, Sarasin A, Roth-Harer A, Fastabend A, Dunemann L, Lichtensteiger W and

24
25 468 Winneke G (1999). Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor

26
27 469 1254: effects on organ weights, aromatase activity, sex hormone levels, and sweet preference

28
29 470 behavior. *Toxicol Appl Pharmacol* 158: 231-43.

30
31 471

32
33 472 Henkin RI, Martin BM and Agarwal RP (1999a). Decreased parotid saliva gustin/carbonic

34
35 473 anhydrase VI secretion: an enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. *Am*

36
37 474 *J Med Sci* 318: 380-91.

38
39 475

40
41 476 Henkin RI, Martin BM and Agarwal RP (1999b). Efficacy of exogenous oral zinc in treatment of

42
43 477 patients with carbonic anhydrase VI deficiency. *Am J Med Sci* 318: 392-405.

44
45
46
47
48
49

1
2
3 481 development and growth factor mRNA expression of the submandibular salivary gland in
4
5 482 immature female rats. Toxicologic pathology 40: 593-604.
6
7 483
8
9 484 Li AK, Schattenkerk ME, De Vries JE, Ford WD and Malt RA (1983). Growth and metabolic
10
11 485 alterations after submandibular sialadenectomy in male mice. Am J Physiol 244: R41-4.
12
13 486
14
15 487 Liu A, Flores C, Kinkead T, Carboni AA, Menon M and Seethalakshmi L (1994). Effects of
16
17 488 sialoadenectomy and epidermal growth factor on testicular function of sexually mature male mice.
18
19 489 J Urol 152: 554-61.
20
21 490
22
23 491 Lugaz O, Pillias AM, Boireau-Ducept N and Faurion A (2005). Time-intensity evaluation of acid
24
25 492 taste in subjects with saliva high flow and low flow rates for acids of various chemical properties.
26
27 493 Chem Senses 30: 89-103.
28
29 494
30
31 495 Mathison R (1995). The Submandibular Glands: a role in homeostasis and allostasis. Biomedical
32
33 496 Reviews 4: 61-69.
34
35 497
36
37 498 Matsuo R (2000). Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. Crit Rev Oral Biol Med 11:
38
39 499 216-29.
40
41 500
42
43 501 Moreira JE, Ball WD, Mirels L and Hand AR (1991). Accumulation and localization of two adult
44
45
46
47
48
49

- 1
2
3 505 Morris-Wiman J, Sego R, Brinkley L and Dolce C (2000). The effects of sialoadenectomy and
4
5 506 exogenous EGF on taste bud morphology and maintenance. *Chem Senses* 25: 9-19.
6
7 507
8
9 508 Norris MB, Noble AC and Pangborn RM (1984). Human saliva and taste responses to acids
10
11 509 varying in anions, titratable acidity, and pH. *Physiology & behavior* 32: 237-44.
12
13 510
14
15 511 Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
16
17 512 *Nucleic Acids Res* 29: e45.
18
19 513
20
21 514 Prutkin J, Fisher EM, Etter L, Fast K, Gardner E, Lucchina LA, Snyder DJ, Tie K, Weiffenbach J
22
23 515 and Bartoshuk LM (2000). Genetic variation and inferences about perceived taste intensity in mice
24
25 516 and men. *Physiology & behavior* 69: 161-73.
26
27 517
28
29 518 Reyes AB and Wakasugi N (1995). Long-term influence of sialoadenectomy on reproductive
30
31 519 performance of male mice. *J Reprod Fertil* 105: 279-85.
32
33 520
34
35 521 Speirs RL (1971). The effects of interactions between gustatory stimulation the reflex flow-rate of
36
37 522 human parotid saliva. *Arch Oral Biol* 16: 349-65.
38
39 523
40
41 524 Stroheker T, Chagnon MC, Pinnert MF, Berges R and Canivenc-Lavier MC (2003). Estrogenic
42
43 525 effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative
44
45
46
47
48
49

1
2
3 530

4
5 531 Tarttelin MF and Gorski RA (1971). Variations in food and water intake in the normal and acyclic
6
7 532 female rat. *Physiology & behavior* 7: 847-52.

8
9 533

10
11 534 Vinggaard AM, Christiansen S, Laier P, Poulsen ME, Breinholt V, Jarfelt K, Jacobsen H, Dalgaard
12
13 535 M, Nellemann C and Hass U (2005). Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the
14
15 536 male rat offspring. *Toxicol Sci* 85: 886-97.

16
17 537

18
19
20 538 Xu X, Tan L, Himi T, Sadamatsu M, Tsutsumi S, Akaike M and Kato N Changed preference for
21
22 539 sweet taste in adulthood induced by perinatal exposure to bisphenol A-A probable link to
23
24 540 overweight and obesity. *Neurotoxicol Teratol* 33: 458-63.

25
26 541

27
28
29 542 Zucker I, Wade GN and Ziegler R (1972). Sexual and hormonal influences on eating, taste
30
31 543 preferences, and body weight of hamsters. *Physiology & behavior* 8: 101-11.

32
33 544

34
35 545

36
37 546 Figure Legends

38
39 547 FIGURE.1

40
41
42 548 Intake and preference for 0.3% saccharin solution measured in male rat offspring at PND21 after
43
44 549 gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN),
45
46 550 vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN). (a) Saccharin consumed per 100g BW per day.
47
48
49

555 FIGURE 2

556 Intake and preference for 0.3% saccharin solution measured in male adult rat at PND100 after
557 gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN),
558 vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN). (a) saccharin consumed per 100g BW per day.
559 (b) Water intake per 100g BW per day. (c) saccharin preference ratio calculated as described in
560 Materials and methods section. Values are expressed as mean \pm SD (n = 12).

561 FIGURE 3

562 Submandibular salivary gland histology in male offspring at PND25 after gestational and
563 lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and
564 their mixture (GEN+VIN). Representative photomicrographs of Masson's trichrome stained
565 sections (5- μ m sections, \times 200 final magnification). Seromucous acini are indicated by arrows,
566 proacinar cells by arrows head and striated ducts by stars. The male control (a) group SSG had
567 very few proacinar cells, whereas the SSG in the male GEN (b), VIN (c), and GEN+VIN (d)
568 groups had more proacinar cells.

569 FIGURE 4

570 Morphometric results of submandibular salivary gland at PND25 after gestational and lactational
571 exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and their mixture
572 (GEN+VIN). The number of pro-acinar cells per mm² (a), the number of striated ducts (b) per mm²
573 and the area of striated ducts expressed in μ m² (c) are represented as the mean value \pm SD for each
574 group (n = 6). Different intergroup values (Tukey's test) are indicated by the following symbols:
575 ** P < 0.01; * P < 0.05.

1
2
3 580 sections (5- μ m sections, \times 200 final magnification). Seromucous acini are indicated by arrows and
4
5 581 granular convoluted tubules (GCTs) by stars. The male CTRL (a) group SSG and the SSG of GEN
6
7 582 (b), VIN (c), and GEN+VIN (d) groups had similar aspect.

8
9
10 583 FIGURE 6

11
12 584 Morphometric results of submandibular salivary gland at PND100 after gestational and lactational
13
14 585 exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and their mixture
15
16 586 (GEN+VIN). The number of granular convolutes tubules (GCTs) per mm² (a), and the area of
17
18 587 GCTs are expressed in μ m² (c) are represented as the mean value \pm SD for each group (n = 6).

19
20
21 588 FIGURE 7

22
23 589 Effect of gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN),
24
25 590 vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN) on the mRNA expression of sex hormone
26
27 591 receptors (a,b,c) and growth factors (d,e,f) in the submandibular salivary gland of immature male
28
29 592 rats at postnatal day 25 using real-time PCR method. Values are mean \pm SD (n=10). Intergroup
30
31 593 differences are (Tukey's test) are indicated by the following symbols: ** P < 0.01; * P < 0.05.

32
33
34 594 FIGURE 8

35
36 595 Effect of gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN),
37
38 596 vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN) on the mRNA expression of sex hormone
39
40 597 receptors (a,b) and growth factors (c,d,e) in the submandibular salivary gland of adult male rats at
41
42 598 postnatal day 100 using real-time PCR method. Values are mean \pm SD (n=10). Intergroup
43
44 599 differences are (Tukey's test) are indicated by the following symbols: ** P < 0.01; * P < 0.05.

45
46
47
48 600 FIGURE 9
49

1
2
3 604 25 using real-time PCR method. Values are mean \pm SD (n=10). Intergroup differences are

4
5 605 (Tukey's test) are indicated by the following symbols: ** P < 0.01; * P < 0.05.

6
7 606 FIGURE 10

8
9 607 Effect of gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN),

10
11 608 vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN) on the mRNA expression of gustin (a), cystatin

12
13 609 C (b), and mucin 10 (c) in the submandibular salivary gland of adult male rats at postnatal day

14
15 610 100 using real-time PCR method. Values are mean \pm SD (n=10). Intergroup differences are

16
17 611 (Tukey's test) are indicated by the following symbols: ** P < 0.01; * P < 0.05.

18
19 612

20
21 613

22
23 614

24
25 615

26
27 616

28
29 617

30
31 618

32
33 619

34
35 620

36
37 621

38
39 622

40
41 623

42
43 624

44
45
46
47
48
49

629 TABLE 1 Primers Used for Real-Time PCR Analysis

Genes	Primer Sequence (Forward and Reverse)	Amplicon Size (bp)	Hybridation Temperature (°C)
RPS9	5'- GCA AGC AGG TGG TGA ACA TTC C- 3' 5'- CCA TAA GGA GAA CGG AGG GAG AAG- 3'	85	60
ER α	5'-TCC AGC AGC AGC GAG AAG G- 3' 5'-GTC GTT ACA CAC AGC ACA GTA GC- 3'	75	60
AR	5'-ACC ATA TCT GAC AGT GCC AAG GAG - 3' 5'-TCC AGT GCT TCC ACA CCC AAC- 3'	74	60
PR	5'-TGG TCT AAG TCT CTG CCT CTG CTC- 3' 5'-CCA TAA GGA GAA CGG AGG GAG AAG - 3'	186	60
EGF	5'-TTG AAA GGA TTT GCT GGC GAT GG- 3' 5'-TGG ACG AGG TGG GAG GAC GG- 3	88	60
TGF α	5'-TCA CAG CAG CCA GTA CCA TCC - 3' 5'-ATG TCC AAC CAG ATT TGC CTC AAC - 3'	139	60
NGF	5'-TGA TCG GCG TAC AGG CAG AAC- 3' 5'-GCG GAG GGC TGT GTC AAG G- 3'	110	60
ACVI (Gustin)	5'-GAGAAGGGATGTGGGTGAGA 3' 5'-GGAGGTTCGGGGTGATTTAT 3'	212	60
Mucin10 (Muc10)	5' -GCCAAAACCACATCCATACC 3' 5' -TATATCCTGGAGGGCAGACG 3'	191	60

631 TABLE 2 Effect of gestational and lactational exposure to genistein, vinclozolin and genistein+vinclozolin (1mg/kg/BW) on developmental
 632 parameters (mean ± SD) in male offspring at PND25 and PND110

	Control	Genistein	Vinclozolin	Genistein+Vinclozolin	ANOVA (F-value P-value)
Total pups/litter	10.7 ± 3.0	11.3 ± 3.3	11.8 ± 3.7	12.9 ± 3.8	NS
Sexratio(% male)	50.7	52.4	57.7	45.4	
Body Weight (g) ¹ at PND21 (N=11, 10, 12, 11)	49.9± 3.5	50.2 ± 3.5	46.4 ± 4.4	48.7 ± 3.8	NS
AGD (mm/g Body Weight) ¹ (N=11, 10, 12, 11)	0.274 ± 0.014	0.264 ± 0.014 ^{c*}	0.285 ± 0.028	0.276 ± 0.032	2.99, P < 0.05
Day of Preputial Separation ¹ (N = 8,9,9,8)	40.5 ± 2.5	41.4 ± 2.6	42.9 ± 1,6	42.7 ± 1.9	NS
Body Weight (g) ² at PND25 (n = 10)	67.30 ± 4.74	67.70± 5.33	64.3 ± 6.07	65 ± 5.21	NS
SSG Weight (g/100g Body Weight) ² at PND25	0.232 ± 0.014	0.224 ± 0.017	0.224 ± 0.017	0.224 ± 0.017	NS
Body Weight (g) ² at PND 110 (n = 10)	414.2 ± 57.2	455.4 ± 34.4	416.2 ± 31.4	437.6 ± 47.4	NS
SSG Weight (g/100g Body Weight) ² at PND110(n=10)	0.154 ± 0.021	0.141 ± 0.023	0.152 ± 0.014	0.145 ± 0.019	NS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

633

634 ¹Body Weight and Anogenital Distance measurement at weaning (PND21): N = number of litter;

635 ²Body Weight and SSG Weight at sacrifice (PND25 and PND110): n=number of animals.

636 Values are expressed as mean ± SD.

637 c: vs vinclozolin * p < 0.05.

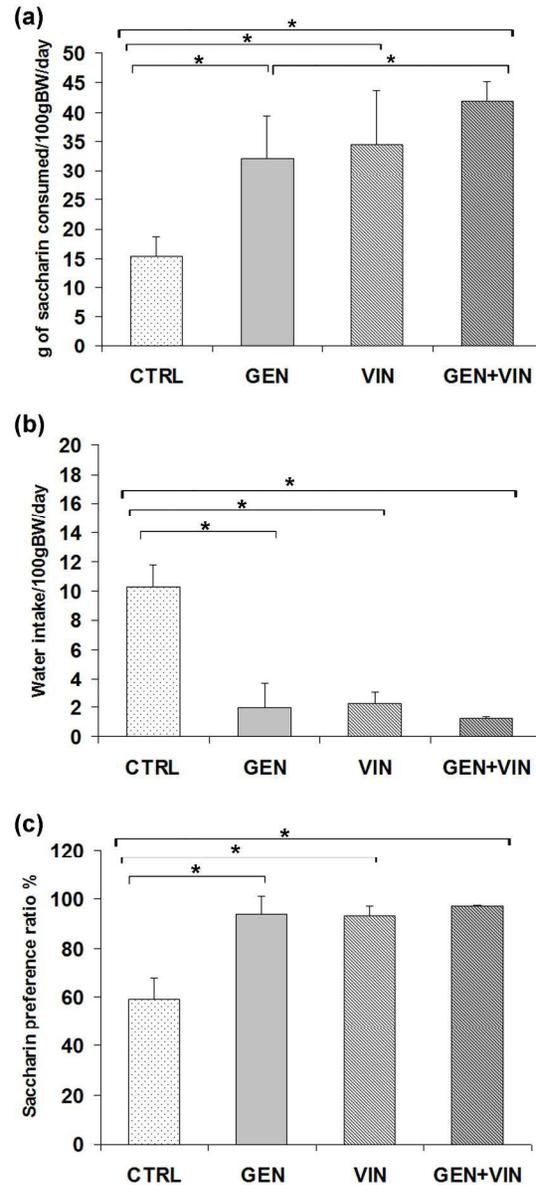


Figure 1 Intake and preference for 0.3% saccharin solution measured in male rat offspring at PND21 after gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN). (a) Saccharin consumed per 100g BW per day. (b) Water intake per 100g BW

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

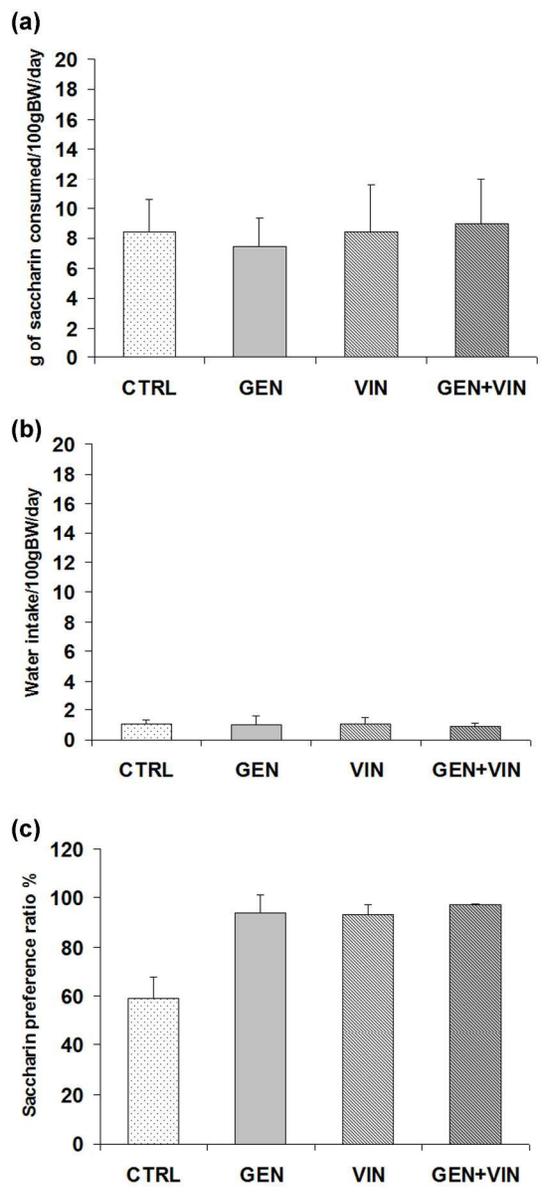


Figure 2 Intake and preference for 0.3% saccharin solution measured in male adult rat at PND100 after gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN). (a) saccharin consumed per 100g BW per day. (b) Water intake per 100g BW

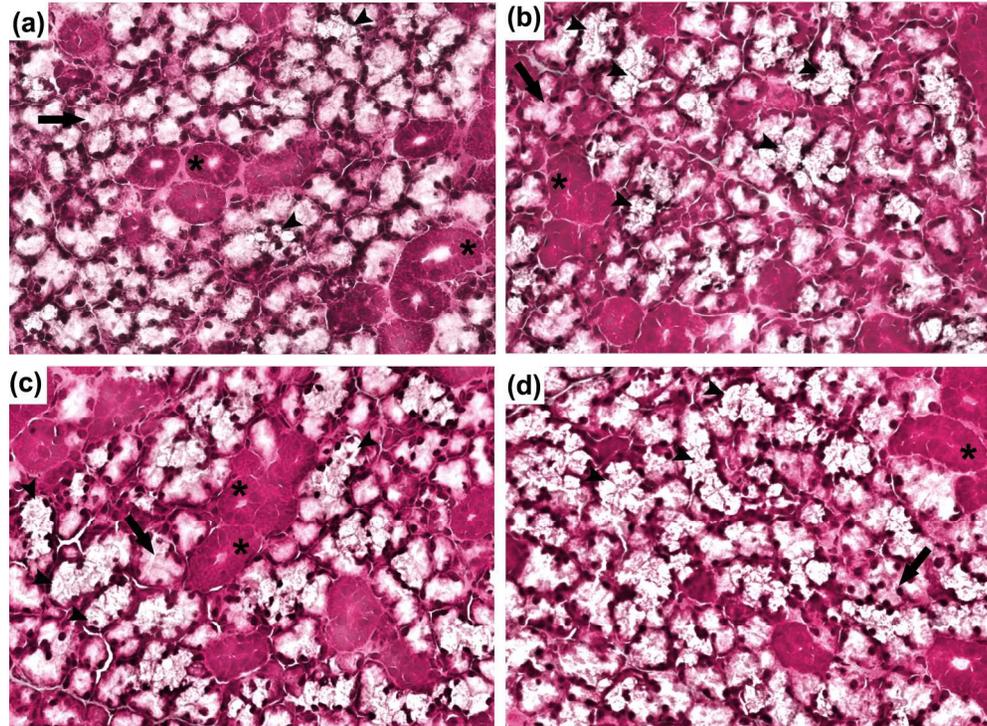


Figure 3 Submandibular salivary gland histology in male offspring at PND25 after gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN). Representative photomicrographs of Masson's trichrome stained sections (5- μ m sections, 200 final magnification). Seromucous acini are indicated by arrows, proacinar cells by arrowheads and striated ducts by stars. The male control (a) group SSG had very few proacinar cells, whereas the SSG in the male GEN (b), VIN (c), and GEN+VIN (d) groups had more proacinar cells.

180x131mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

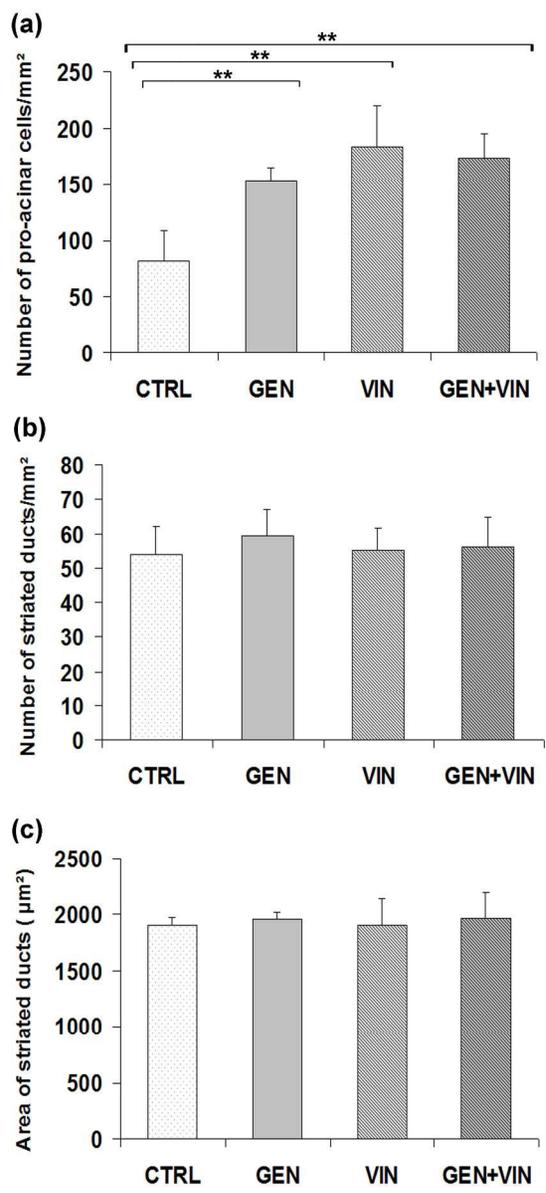


Figure 4 Morphometric results of submandibular salivary gland at PND25 after gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN). The number of pro-acinar cells per mm² (a), the number of striated ducts (b) per mm² and the

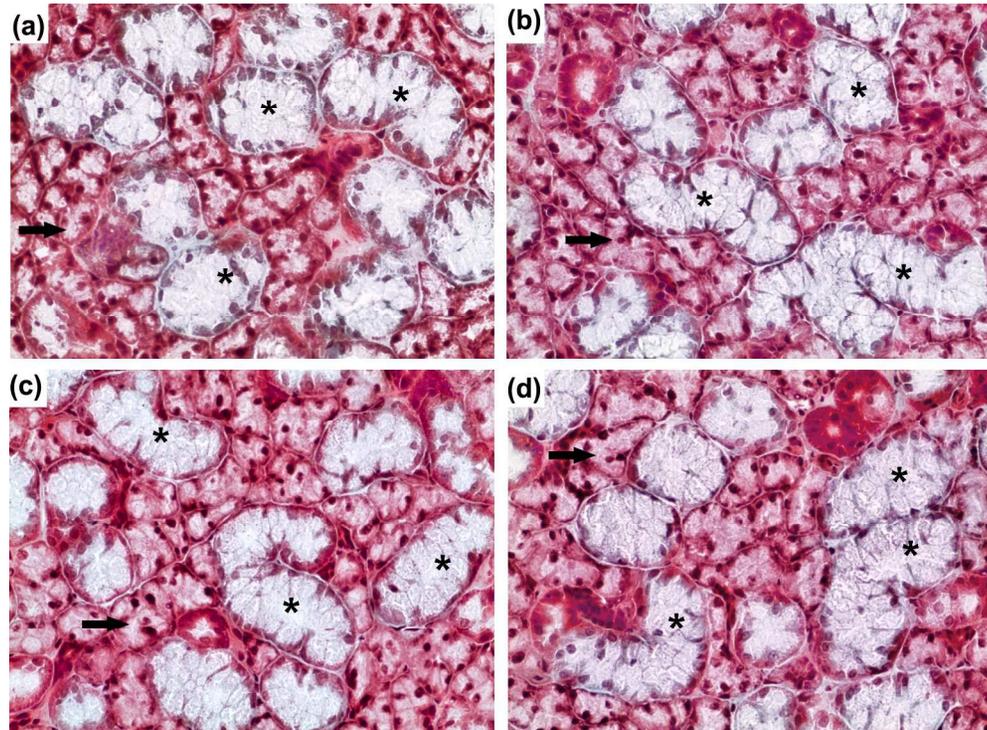


Figure 5 Submandibular salivary gland histology in male offspring at PND100 after gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN). Representative photomicrographs of Masson's trichrome stained sections (5- μ m sections, 200 final magnification). Seromucous acini are indicated by arrows and granular convoluted tubules (GCTs) by stars. The male CTRL (a) group SSG and the SSG of GEN (b), VIN (c), and GEN+VIN (d) groups had similar aspect.

180x131mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

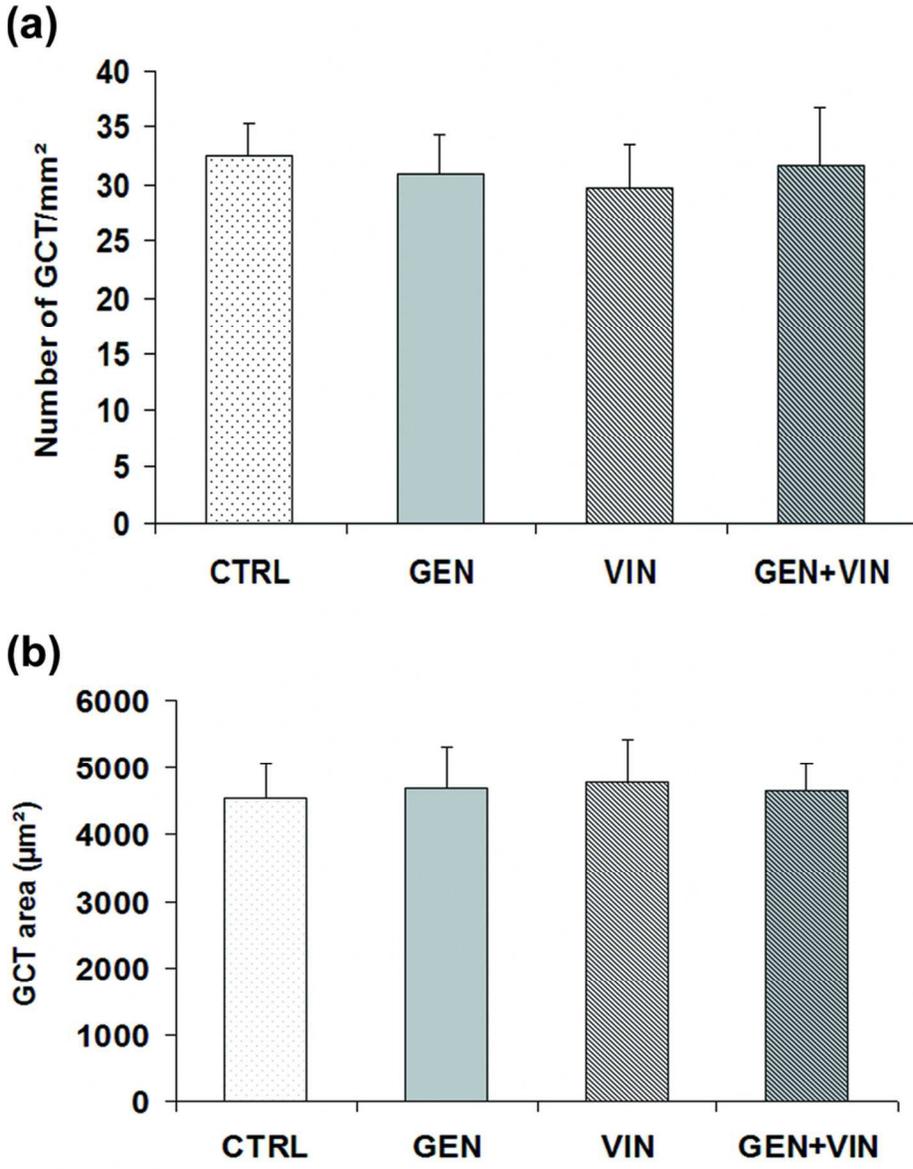


Figure 6 Morphometric results of submandibular salivary gland at PND100 after gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN). The number of granular convolutes tubules (GCTs) per mm² (a), and the area of GCTs are

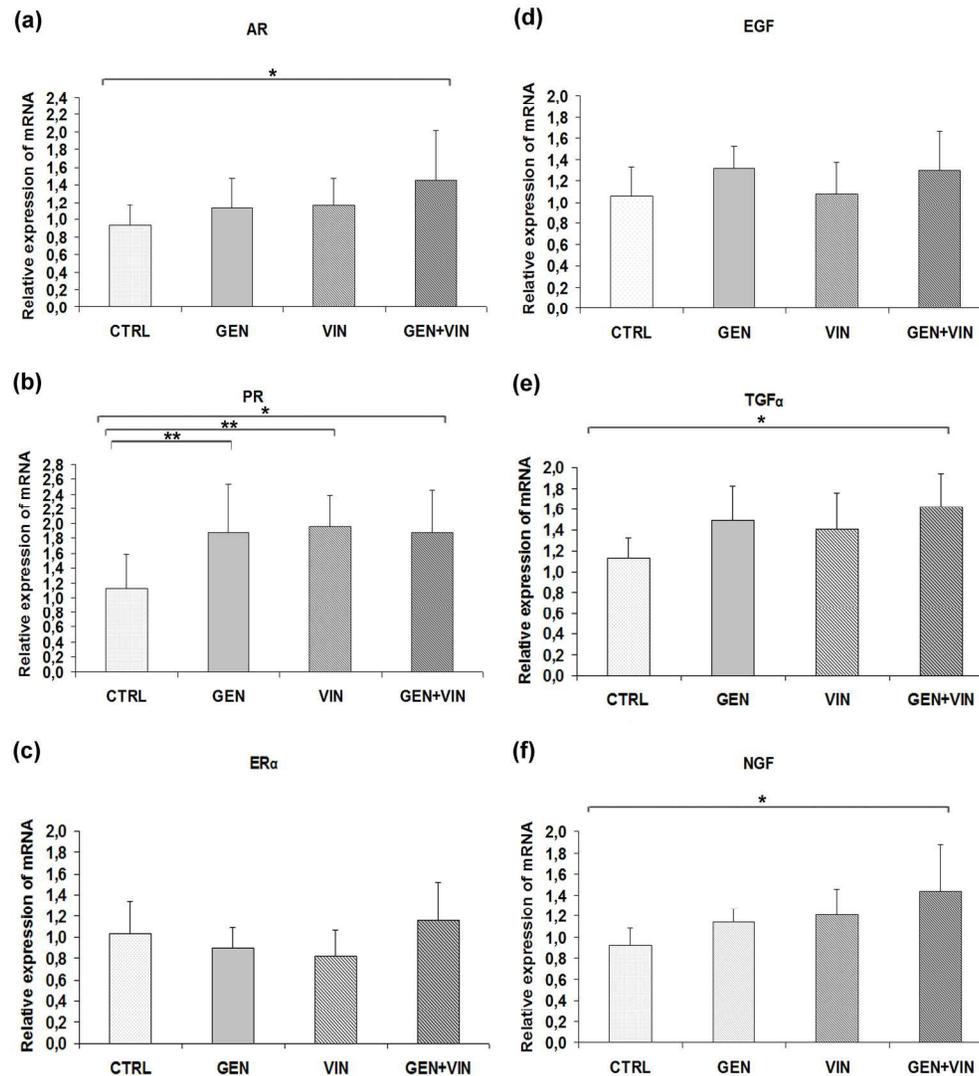


Figure 7 Effect of gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN) on the mRNA expression of sex hormone receptors (a,b,c) and growth factors (d,e,f) in the submandibular salivary gland of immature male rats at postnatal day 25 using real-time PCR method. Values are mean + SD (n=10). Intergroup differences (Tukey's test) are indicated by the following symbols: ** P < 0.01; * P < 0.05.

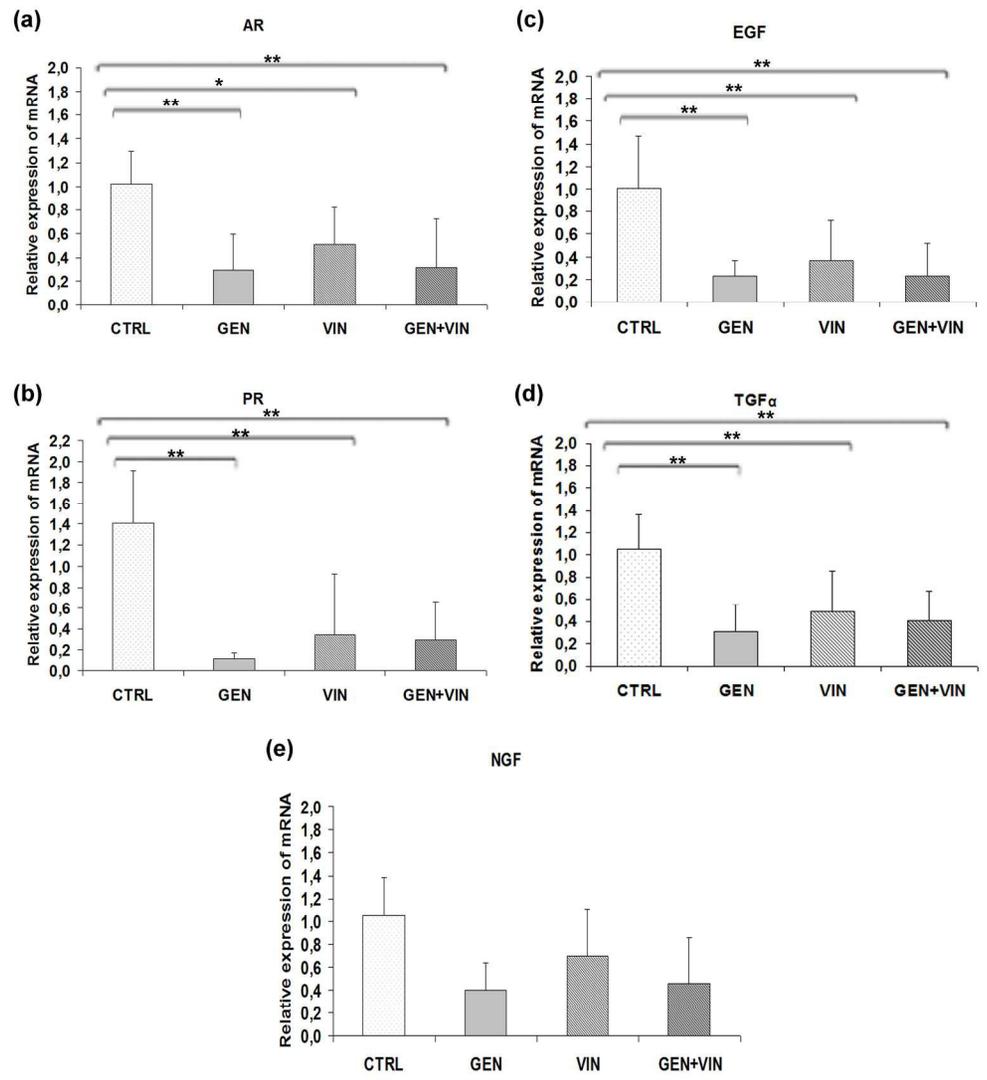


Figure 8 Effect of gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN) on the mRNA expression of sex hormone receptors (a,b) and growth factors (c,d,e) in the submandibular salivary gland of adult male rats at postnatal day 100 using real-time PCR method. Values are mean + SD (n=10). Intergroup differences are (Tukey's test) are indicated by the following symbols: ** P < 0.01; * P < 0.05.

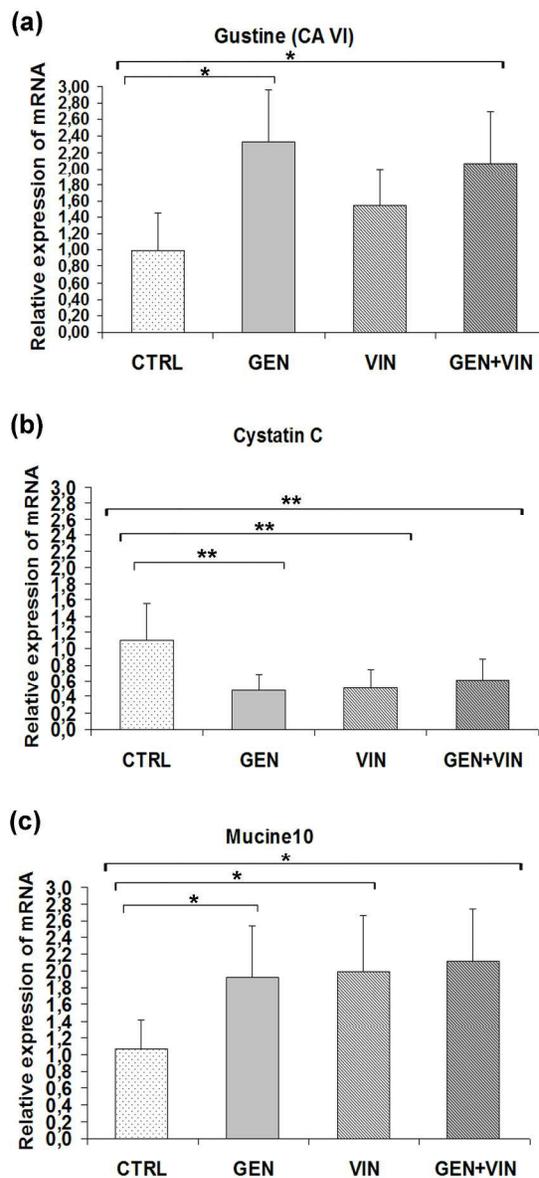


Figure 9 Effect of gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN) on the mRNA expression of gustin (a), cystatin C (b), and mucin 10 (c) in the submandibular salivary gland of immature male rats at postnatal day 25 using real-time

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

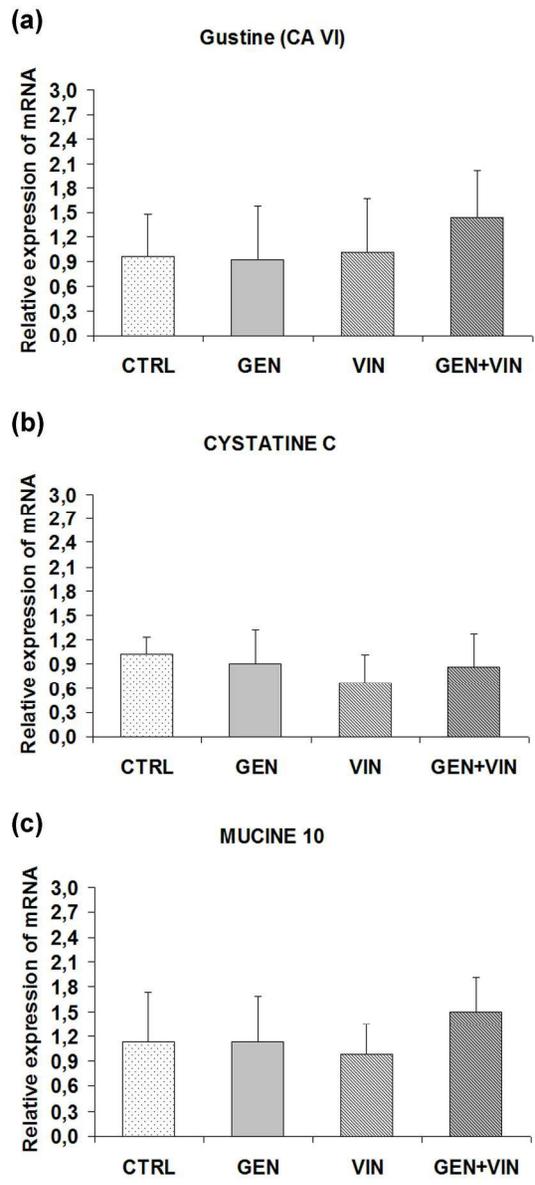


Figure 10 Effect of gestational and lactational exposure to 1mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN) on the mRNA expression of gustin (a), cystatin C (b), and mucin 10 (c) in the submandibular salivary gland of adult male rats at postnatal day 100 using real-time

1.1.1.1. Croissance et développement corporel

L'exposition journalière à la génistéine et/ou vinclozoline à la dose 1mg/kg PC durant la période de gestation-lactation n'entraîne pas d'effets toxiques apparents : elle n'affecte ni la prise de poids, ni la prise alimentaire ni la consommation d'eau des mères gestantes. Les traitements n'ont également pas d'effet significatif sur le nombre de portées, le sex-ratio, et le poids corporel des animaux à la naissance. Par contre la distance ano-génitale (DAG) présente une différence significative entre les quatre groupes (ANOVA, $p < 0.05$) : la vinclozoline diminue significativement la DAG relative par rapport au groupe GEN (+ 10.15 %; $p < 0.05$). Le poids corporel ainsi que le poids des glandes SM ne sont pas affectés par les traitements au stade J25 et au stade J100 (Kouidhi et al.; Table1).

1.1.1.2. Préférence au sucré

- *Au stade immature (J25)*, les mâles consomment un volume important de la solution saccharine comparé au groupe CTRL (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). La consommation en solution de saccharine augmente dans les groupes GEN (+111.22 %; $p = 0.029$), VIN (+126 %; $p = 0,034$), et encore plus au niveau du groupe mélange GEN+VIN (+175.44%; $p = 0.034$). Cette importante consommation en saccharine est compensée par une diminution significative de la consommation d'eau au niveau dans tous les groupes traités ($p = 0.03$ GEN (-81%), VIN (-78%), GEN+VIN (-88%) vs. CTRL). En conséquence, la préférence au sucré, est passée de 70% au niveau du groupe CTRL à plus de 90% au niveau de tous les groupes traités (Kruskal Wallis, $p < 0.05$). (Kouidhi et al.; Figure 1)

- *Au stade adulte (J100)*, une diminution de la consommation totale (saccharine + eau) avec une augmentation de la préférence (90%) sont observés au niveau du groupe CTRL par rapport au stade immature, mais aucune différence significative n'a été notée entre les différents groupes. (Kouidhi et al. ; Figure 2)

1.1.1.3. Morphométrie de la glande SM

Au stade J25, la coloration des coupes au Trichrome de Masson permet d'observer chez les animaux contrôles une structure typique des SM immatures, avec la prédominance des acini séromuqueux différenciés (colorés en rose-blanc), et seulement quelques cellules pro-acinaires (incolores), qui sont des résidus embryonnaires indifférenciés, et qui sont les précurseurs des acini séromuqueux ; on observe aussi les canaux striés (colorés en rose vif) qui vont se différencier plus tard pour donner les tubules granulaires contournés (GCT), qui sont des segments spécifiques de la glande SM adulte des rongeurs. Le tissu conjonctif quant à lui est coloré en vert (Kouidhi et al. ; Figure3). Les

glandes SM des rats immature J25 traités avec la génistéine et/ou la vinclozoline, montrent une prédominance de pro-acini par rapport aux animaux contrôles (ANOVA, $p < 0.001$). Cette persistance des cellules embryonnaires est plus marquée chez le groupe VIN (+123.7%; $p < 0.001$) et le groupe mélange GEN+VIN (+111.2%; $p < 0.001$) que chez le groupe GEN (+86%; $p < 0.001$). Concernant les canaux striés, aucune différence significative entre les quatre groupes n'est observée. (Kouidhi et al. ; Figure4). *Au stade J100*, les SM du groupe Contrôle ont un aspect de glande mature avec des acini séro-muqueux (colorés en rose-blanc), des tubules granulaires (GCT) différenciés (incolore), par contre quelques canaux striés seulement sont observés. Chez les animaux traités, les glandes SM ne présentent pas de différence d'aspect morphométrique par comparaison aux glandes SM des rats contrôles (Kouidhi et al. ; Figure 5). Ceci est confirmé par la quantification du nombre et la détermination des aires des GCT (Kouidhi et al. ; Figure 6).

1.1.1.4. Expression des ARNm codant pour les récepteurs hormonaux

Les récepteurs hormonaux ont été choisis comme bio-marqueurs de la réponse hormonale des SM.

Chez les animaux mâles immatures (J25), les glandes SM du groupe contrôle expriment différemment les récepteurs des hormones sexuelles : le AR est le récepteur le plus abondant (Ct = 27) en comparaison avec le ER α (Ct = 31) et le PR (Ct = 30); par contre le ER β n'est pas détecté (Ct > 36) bien que la même séquence de ER β a été utilisé pour détecter le récepteur des estrogènes au niveau de l'utérus (Ct = 25).

L'expression de l'AR est modifiée par les traitements (ANOVA, $p < 0.05$) mais pas celle de l'ER α (Kouidhi et al. ; Figure 7). L'expression du AR est significativement plus importante au niveau du groupe GEN+VIN par rapport au CTRL (+16.73; $p < 0.04$). On observe aussi une augmentation significative de l'expression du PR (ANOVA, $p < 0.01$), cette augmentation est significative au niveau des groupes GEN et GEN+VIN comparés au groupe CTRL (respectivement +66.22%; $p < 0.05$; +65.6%; $p < 0.05$) et seulement une tendance au niveau du groupe VIN (+72.96%; $p < 0.1$).

Chez les rats mâles adultes (J100) les transcrits des récepteurs ER α et du ER β ne sont pas détectés (Ct > 36) et seulement ceux des récepteurs AR (Ct = 29) et PR (Ct = 28) sont exprimés au niveau des glandes SM des animaux non traités. Nous avons donc considéré seulement l'expression de ces deux derniers pour la comparaison entre groupe (Kouidhi et al. ; Figure 8a et b) l'expression des transcrits L'analyse de variance révèle une différence significative de l'expression du AR ($p < 0.01$) et du PR ($p < 0.001$). Le test de Tukey confirme qu'il y a une diminution significative de l'expression du AR au niveau de tous les groupes

traités par rapport au groupe CTRL (GEN : -71%; $p < 0.001$; VIN : -50.4%; $p < 0.05$ et GEN+VIN : -69.1%; $p < 0.01$) et une importante diminution significative du PR au niveau des groupes GEN (-80%, $p < 0.001$) ; VIN (-75%, $p < 0.001$) et GEN+VIN (-80%, $p < 0.001$).

1.1.1.5. Expression des ARNm codant pour les facteurs de croissance

L'expression des transcrits codant pour les facteurs de croissances EGF, NGF et TGF a été mesurée pour évaluer l'activité endocrine des glande SM.

Chez les rats immatures (J25), l'expression de l'EGF est fortement exprimée au niveau des glandes SM des rats contrôles (Ct = 25), par contre les ARNm du TGF α et du NGF sont moins exprimés (respectivement : Ct = 29 et Ct = 30). L'expression relative de l'EGF n'est pas significativement différente entre les quatre groupes, en revanche l'ANOVA montre des différences significatives entre les quatre groupes quant à l'expression du TGF α ($p < 0.05$), tout comme l'expression relative du NGF ($p < 0.05$). Le test de Tukey révèle qu'aucun de ces gènes n'est affecté par la GEN et la VIN. Par contre, ils sont similairement plus exprimés au niveau du groupe GEN+VIN par rapport au groupe CTRL (TGF α : +29%; $p < 0.05$ et NGF: +16.73%; $p < 0.01$) (Kouidhi et al. ; figure 7 d, e et f).

Chez le jeune adulte (JJ100), seuls les ARNm de l'EGF sont bien exprimés au niveau de la glande SM des animaux contrôles (Ct = 19), les ARNm du TGF α sont moins exprimés (respectivement : Ct = 31 et Ct = 32). Chez les rats traités, on observe une diminution générale de l'expression des ARNm des facteurs de croissance (Kouidhi et al. ;figure 8 c, d et e), et l'expression de l'EGF est significativement différente entre les quatre groupes (ANOVA, $p < 0.001$), ainsi que celle du TGF α (ANOVA , $p < 0.001$). Par contre aucune différence significative n'a été observée quant à l'expression du NGF. Le test de Tukey montre que l'expression des ARNm de l'EGF et celle du TGF α sont fortement affectés par la GEN (EGF: -76.95%; $p < 0.001$; TGF α : -70.52%; $p < 0,001$), la VIN (EGF: -64.1%; $p < 0.01$; TGF α : -53.68%; $p = 0.01$) et ainsi que par le mélange GEN+VIN (EGF: -59.74%; $p < 0.001$; TGF α : -61.72%; $p < 0.01$) en comparaison au groupe CTRL.

1.1.1.6. Expression des protéines salivaires gustatives

La Mucine 10, la Gustine (CAVI) et la Cystatine C ont été choisies en tant que biomarqueurs moléculaires des sécrétions exocrines de la glande SM et qui sont impliquées dans la perception gustative. L'expression des ARNm de la Cystatine C chez les rats

contrôles aux deux stades J25 et J100 est modérée ($Ct < 25$) par contre la Mucine 10 et de la gustine s'expriment très bien au niveau de la glande SM ($Ct < 17$).

Chez les rats immatures à J25, l'expression de la gustine est fortement augmentée par la GEN seule (+118.8%, $p < 0.05$) ou en mélange avec la VIN (+64%, $p < 0.05$) mais le traitement avec la VIN seule n'a aucun effet (Kouidhi et al. ; Figure 9). En revanche, l'expression de la Cystatine C est fortement diminuée par la GEN (-57.2%, $p < 0.001$) et à moindre mesure par la VIN seule (-54%, $p < 0.001$), mais cette diminution est plus modérée au niveau du groupe mélange GEN+VIN (-38.7%, $p < 0.01$). L'expression relative des ARNm de la Mucine 10 augmente avec le traitement à la génistéine GEN (+80.9%, $p < 0.05$) et similairement avec la VIN (+89.52%, $p < 0.05$) et le mélange GEN+VIN (+85.7%, $p < 0.05$).

Au stade J100, l'expression des ARNm de ces gènes n'est affectée par aucun des traitements (Kouidhi et al. ; Figure 10).

1.1.2. Résultats complémentaires (non présentés au niveau de la publication)

1.1.2.1. Prolifération cellulaire

L'indice de prolifération cellulaire dans les glandes salivaires a été recherché afin de voir si les modifications structurales s'accompagnaient d'un effet sur la prolifération des cellule du tissu sécrétoire.

Au stade J25 on observe les cellules marquées au Ki-67 (noyaux marrons foncé) spécialement au niveau des acini et des pro-acini mais la contre coloration à l'hématoxyline ne permet pas de différencier entre les deux types cellulaires. Le nombre de noyaux marqués au Ki-67 n'est pas différent entre les quatre groupes avec toutefois une tendance à l'augmentation ($p < 0.1$) au niveau des groupes VIN et GEN+VIN (Figure 43).

Au stade J100 on n'a pas retrouvé le marquage au Ki-67, ni au niveau des SM des rats contrôles, ni au niveau des SM des animaux traités.

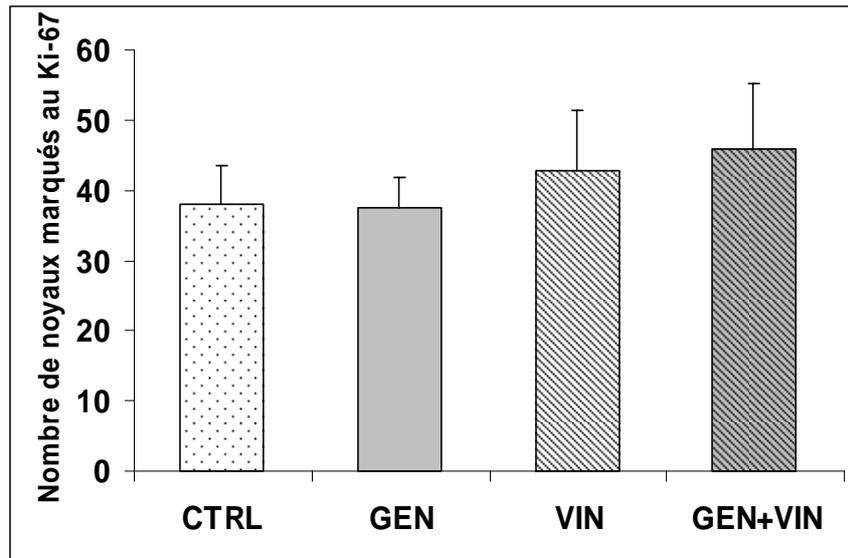


Figure 43 : Nombre de noyaux marqués par le Ki-67 au niveau des glandes SM au stade J25 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).

Les valeurs représentent des moyennes \pm écart type. (n=6)

1.1.2.2. EGF sérique

La glande submandibulaire est le principal producteur de facteur de croissance EGF chez le rat. L'EGF sérique a été mesuré afin d'identifier un lien éventuel entre les taux circulants d'EGF et l'expression du transcrit de l'EGF dans les glandes salivaires. Chez les animaux témoins, les taux circulants d'EGF 25 fois plus faibles que ceux des animaux adultes. L'exposition à la génistéine et/ou la vinclozoline pendant la période de gestation et lactation n'a pas d'effet sur la concentration de l'EGF sérique au stade J25 mâle ni au stade J100 mâle. Il n'existe aucune différence significative entre les quatre groupes (Figure 44A et 44B).

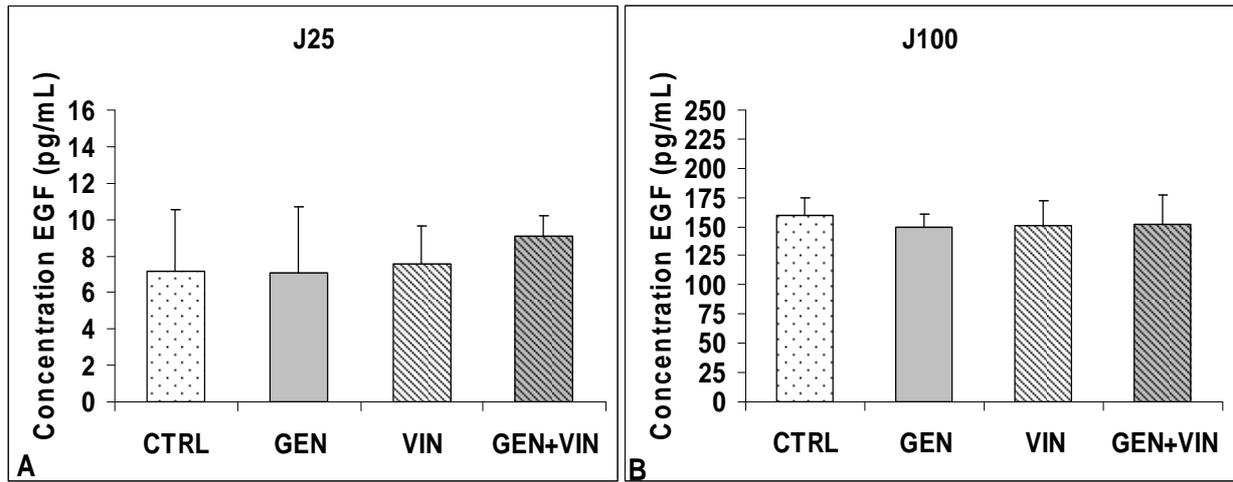


Figure 44: Concentration de l'EGF sérique circulant chez les mâles au stade J25 (A) et au stade J100 (B) suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).

Les valeurs représentent des moyennes \pm écart type n=10

En résumé, une exposition précoce en génistéine et en vinclozoline, seule ou en mélange, ralenti l'apparition de la puberté et la maturation de la glande salivaire. Au stade immature, cela se traduit par une modification des structures sécrétrices, sans pour autant affecter l'indice de prolifération, qui rejoignent la normalité à l'âge adulte. D'un point de vue sécrétion, au regard des données PCR, tandis que les fonctions exocrines (protéines gustatives) semblent modifiées au stade immature, en lien probable avec l'effet observé sur les structures acinaires et sur les préférences gustatives, seules les fonctions endocrines (facteurs de croissance) sont réprimés à l'âge adulte. Cependant, ces effets n'entraînent pas de modification apparente des taux circulants d'EGF.

1.2. Effets chez la femelle au stade prépubère J35

1.2.1. Effets sur le développement des glandes SM (publication 2)

Les effets de l'exposition précoce sur le développement des glandes salivaires ont été consignés dans la publication ci-jointe, parue dans le journal « Toxicological Pathology », et dont les illustrations graphiques sont commentées ci-après.

“In Utero and Lactational Exposure to Low-Dose Genistein-Vinclozolin Mixture Affects the Development and Growth Factors mRNA Expressions of the Submandibular Salivary Gland in Immature Female Rats”.

Wided Kouidhi, Catherine Desmetz, Afef Nahdi, Raymond Bergès, Jean-Pierre Cravedi, Jaques Auger, Michèle El May et Marie Chantal Canivenc-Lavier.

Toxicologic Pathology, 40(4):593-604, 2012

Toxicologic Pathology

<http://tpx.sagepub.com/>

In Utero and Lactational Exposure to Low-Dose Genistein-Vinclozolin Mixture Affects the Development and Growth Factors mRNA Expressions of the Submandibular Salivary Gland in Immature Female Rats

Wided Kouidhi, Catherine Desmetz, Afef Nahdi, Raymond Bergès, Jean-Pierre Cravedi, Jaques Auger, Michèle El May and Marie Chantal Canivenc-Lavier

Toxicol Pathol published online 7 February 2012

DOI: 10.1177/0192623311436183

The online version of this article can be found at:

<http://tpx.sagepub.com/content/early/2012/02/07/0192623311436183>

A more recent version of this article was published on - May 16, 2012

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

On behalf of:



[Society of Toxicologic Pathology](http://www.sagepublications.com)

Additional services and information for *Toxicologic Pathology* can be found at:

Email Alerts: <http://tpx.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://tpx.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

[Version of Record](#) - May 16, 2012

>> [OnlineFirst Version of Record](#) - Feb 7, 2012

[What is This?](#)

In Utero and Lactational Exposure to Low-Dose Genistein-Vinclozolin Mixture Affects the Development and Growth Factor mRNA Expression of the Submandibular Salivary Gland in Immature Female Rats

WIDED KOUIDHI^{1,2}, CATHERINE DESMETZ², AFEF NAHDI¹, RAYMOND BERGÈS², JEAN-PIERRE CRAVEDI³, JACQUES AUGER⁴,
MICHÈLE EL MAY¹, AND MARIE CHANTAL CANIVENC-LAVIER²

¹Research Unit n° 01/UR/08-07, Tunis El Manar University, Faculty of Medicine, Tunis, Tunisia

²INRA, UMR-1324 CSGA, Dijon, France

³INRA, UMR-1331 TOXALIM, Toulouse, France

⁴Service d'Histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction et CECOS, Hôpital Cochin Paris, France

ABSTRACT

It has been suggested that hormonally controlled submandibular salivary gland (SSG) development and secretions may be affected by endocrine disruptor compounds. We investigated the effects of oral gestation-lactation exposure to 1 mg/kg body weight daily dose of the estrogenic soy-isoflavone genistein and/or the anti-androgenic food contaminant vinclozolin in female rats. The SSGs of female offspring were collected at postnatal day 35 to study gland morphogenesis and mRNA expression of sex-hormone receptors and endocrine growth factors as sex-dependent biomarkers. Because of high expression in neonatal SSG, mRNA expression of transforming growth factor α was also studied. Exposure to genistein, vinclozolin, or a genistein+vinclozolin mixture resulted in significantly lower numbers of striated ducts linked to an increase in their area and lower acinar proliferation (Ki-67-positive nuclei). Exposure to the mixture had the highest significant effects, which were particularly associated with repression of epidermal growth factor, nerve growth factor, and transforming growth factor α expression. In conclusion, early exposure to low doses of genistein and vinclozolin can affect glandular structure and endocrine gene mRNA expression in prepubertal SSG in female rats, and the effects are potentialized by the genistein+vinclozolin mixture. Our study provides the first evidence that SSG are targeted by both estrogenic and anti-androgenic disrupting compounds and are more sensitive to mixtures.

Keywords: endocrine disruptor; phytoestrogen; dietary exposure; salivary glands; morphogenesis; female offspring

INTRODUCTION

Salivary glands are exocrine and endocrine organs involved in homeostasis. Salivary gland dysfunctions can lead to oral disease, taste perception loss, and/or partial or total xerostomia,

and they can occur as a consequence of drug intake, aging, and some pathology such as diabetes mellitus, hypertension, neurological disorders, and depression. Epidemiological studies have revealed evidence of interrelationships between the modification of salivary gland secretions and decrease in sex hormone production; salivary composition changes with aging, but the mouth dryness associated with menopause in healthy women could be corrected by hormonal therapy replacement (Laine and Leimola-Virtanen 1996). Sjogren's syndrome, an autoimmune disease predominant in women that affects lachrymal and salivary gland exocrine functions, is associated with a defect in the production of androgens in the salivary glands (Porola et al. 2007). In rodents, as in humans, the submandibular salivary gland (SSG) strongly expresses androgen (AR) and, to a lesser extent, estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR; Campbell et al. 1990; Ozono et al. 1991; Xu 2003).

The sexual dimorphism of salivary glands has been established, as the involvement of sex hormones in their development and function (Rins de David et al. 1990). Estrogens modulate salivary flow and electrolyte composition (Houssay and de Harfin 1973), whereas androgens induce the synthesis of proteins such as proteinases and kallikreins (Treister et al. 2005). More specifically, both estrogens and androgens regulate the synthesis of two hormonal factors that could be seen

Address correspondence to: Marie Chantal Canivenc-Lavier, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR1324, Institut National de la Recherche Agronomique, 17, rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France; e-mail: Marie-Chantal.Canivenc@dijon.inra.fr

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship and/or publication of this article: This work was supported by the French Programme on Endocrine Disruption (PNRPE; contract MEDD CV 05147), the Tunisian Ministry of higher Education and Scientific Research, INRA, and grants from the Burgundy regional government.

Abbreviations: AGD, anogenital distance; AR, androgen receptor; DAB, diaminobenzidine; DNA, deoxyribonucleic acid; EDC, endocrine disruptor compound; EGF, epidermal growth factor; ER α , estrogen receptor α ; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; GCT, granular convoluted tubule; GD, gestational day; HPLC-DAD, high pressure liquid chromatography-diode array detection; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry; NGF, nerve growth factor; NOAEL, no observed adverse effect level; PCR, polymerase chain reaction; PND, postnatal day; PR, progesterone receptor; RNA, ribonucleic acid; RPS 9, ribosomal protein S9; SSG, submandibular salivary gland; TGF α , transforming growth factor α ; VO, vaginal opening.

as SSG endocrine secretions, namely, nerve growth factor (NGF) and epidermal growth factor (EGF). These factors play a physiological key role, since they are released into the bloodstream (Boyer et al. 1991; Hwang et al. 1991) and are involved with ontogenetic development. Nerve growth factor acts on the sympathetic nervous system, particularly under stress conditions, whereas EGF acts primarily on mammary gland morphogenesis, uterine growth, and gametogenesis (Rougeot et al. 2000). In addition, EGF protects the oral cavity epithelium and maintains taste bud integrity (Morris-Wiman et al. 2000), whereas NGF is more involved in taste perception (Suzuki et al. 2007), behavior, and brain plasticity (Saruta et al. 2010). As a consequence, SSG sialoadenectomy results in taste loss, oral illness, and reproductive disorders (e.g., increased abortion rate and spermatogenesis impairment), which demonstrates that salivary secretions contribute to the regulation of many physiological processes, including sensory perception and immune and inflammatory reactions, but also reproductive and peripheral organ development and/or regeneration (Mathison 1995).

Taken together, these data underline the impact of sex hormones on the systemic role of salivary glands and the deleterious consequences of their dysfunction in homeostasis. Consequently, they lead us to consider salivary glands as potent endocrine disruptor targets. In this way, SSG share some similar characteristics with mammary glands in terms of morphology, sex hormone dependency, cellular mechanisms, and tumor histopathology (Actis 2005). We therefore hypothesized that female SSG morphogenesis and properties could be similarly affected by early exposure to endocrine disruptors (El Sheikh Saad et al. 2011).

We report here on the effect of prepubertal development of female rat SSG following an in utero-lactation oral exposure to nonpharmacologic doses of two reference sex hormone-like disruptors, namely genistein, an estrogenic isoflavone present in mammalian diets, and vinclozolin, an anti-androgenic chemical commonly found in food commodities of plant origin (EFSA 2010). This study was conducted on an experimental model that was particularly suitable because of low doses devoid of endocrine contaminants (phytoestrogen-free diet, cages without Bisphenol A (BPA) or phthalates, filtered water). As previously argued by Lehraiki et al (2011), the 1 mg/kg body weight (BW) dose of genistein has been selected as a safety dose according to the AFSSA's recommendations on human phytoestrogen intake via a soy-based diet (AFSSA-AFSSAPS 2005). This same dose of vinclozolin is lower than the NOAEL combining chronic toxicity, carcinogenicity, and reproductive toxicity in rats (1.2 mg/kg BW/day; U.S. EPA 2003). At these same doses, both chemicals have recently been reported to affect the male reproductive system (Eustache et al. 2009; Lehraiki et al. 2011) and the prepubertal structure of the mammary gland (El Sheikh Saad et al. 2011), either alone or in combination. In the present study, we investigated the effects on several sex-dependent end points of salivary glands, namely morphogenesis, mRNA expression of sex hormone receptors, and mRNA expression of EGF and NGF. The mRNA expression of transforming growth factor α (TGF α) was also studied because of its EGF-like effects and EGF receptor binding

affinity and because of its high expression in neonatal SSG (Mogi et al. 1995). To our knowledge, this is the first study investigating salivary gland susceptibility to estrogenic and anti-androgenic endocrine disruptors.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Genistein was synthesized with a purity of 99% (LCOO, Université Bordeaux 1, Talence, France). Vinclozolin was extracted from the commercial formulation Ronilan (BASF, Levallois-Perret, France) according to Bursztyka et al. (2008). The extract was dried in vacuo, and then recrystallized from methanol. Its purity, as verified by HPLC-DAD (192–400 nm) and GC-MS analysis, was higher than 96% (data not shown). In addition, the absence of the degradation products M1 and M2 was verified by LC-MS.

Animals and Experimental Procedures

All procedures involving rats were approved by the local authorities in accordance with the French Ministry of Agriculture ethical guidelines for the care and use of laboratory animals. Animals used in this study were from the same pool of animals as those studied in the recent reports of Lehraiki et al. (2011) and El Sheikh Saad et al. (2011), and our study is part of a larger study aiming at investigating the developmental effects of low doses of genistein and/or vinclozolin on several sex hormone-regulated organs. A total of sixty specific-pathogen-free (SPF) female and sixty SPF male Wistar Han rats at eight weeks of age (Harlan France SARL, Gannat, France) were acclimatized to SPF housing conditions (22°C room temperature with 55% relative humidity and a twelve-hour light/dark period) for four weeks before mating. To avoid xeno-hormone residues, they were housed in individual polypropylene cages and were allowed ad libitum access to charcoal-filtered water and a purified phytoestrogen-free diet (INRA, Jouy-en-Josas, France; Stroheker et al. 2003).

After mating, females were examined daily to determine the first gestational day (GD1) by examining the presence of spermatozooids in vaginal smears. Dams were randomly allocated to four groups corresponding to control (CTRL), genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and genistein/vinclozolin (GEN-VIN) groups (fifteen rats per group). On parturition day, the litters were weighed, sexed, and standardized at ten offspring. From GD1 to weaning (postnatal day [PND]21), dams received the xeno-hormones orally at the 1 mg/kg BW dose, alone or in combination. Genistein and/or vinclozolin were dissolved in corn oil (Carrefour, Dijon, France) in order to give 2 mL/kg BW. Control animals received the same volume of vehicle alone (2 mL/kg BW). To prevent photolysis and oxidation, solutions were stored at 4°C in closed vials wrapped in aluminum foil.

In the present study, only female pups were studied. Thus, at weaning, ten female offspring per group (one per litter) were marked with implanted chips, and gathered in polypropylene cages (five per cage). They had ad libitum access to

charcoal-filtered water and were fed a soy-free purified diet until sacrifice (PND35). Body weight and food consumption were measured twice a week.

Concomitantly, the anogenital distance (AGD)—a well-known sensitive endpoint for estrogenic and anti-androgenic chemical compounds—was measured at weaning (PND21) by considering up to three females per litter ($n = 40/\text{group}$). In addition, to determine the time of puberty, one female pup per litter was monitored daily for vaginal opening (VO) from PND21 to PND35.

Sacrifice and Sampling

At PND35, female pups were anesthetized with isoflurane (2.5%) followed by rib cage opening and dorsal aorta exsanguination. Submandibular salivary glands were carefully excised, then weighed. The left SSG was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for mRNA analysis. The right SSG was embedded in O.C.T. compound (Sakura Finetek, France), frozen (-56 to -62°C) in an isopentane histobath (Thermo/Shandon Histobath, Cergy Pontoise, France), then stored at -80°C for histological and immunohistochemical analysis.

Quantitative Immunohistochemical Studies

Longitudinal sections of the whole SSG were taken at $5\ \mu\text{m}$ on a Cryostat Leica CM3050 S (Leica, France) at -20°C cut temperature. Slides were air dried and stored at -80°C until analysis.

For histological analysis, cryosections were fixed for ten seconds in RapidFix (Thermo Shandon, France) and stained with Masson Trichrome. Slides were examined with a Nikon Eclipse 600 microscope with an attached DXM1200C camera (Nikon, version 5.03). Microscopic images were captured using a $40\times$ objective (area = $0.0285\ \text{mm}^2$) and analyzed using NIS-Elements Br 3.0 imaging software (Nikon, France). The number and area of striated ducts were determined as the means of thirty fields per animal (six animals per group) to determine the effect of chemical exposure on SSG development. The area of striated ducts was expressed in μm^2 and the count of striated ducts was expressed as their number per unit surface area (number/ mm^2).

Both apoptosis and proliferation were assessed jointly by means of the Novolink Polymer Detection System (Novocastrol Laboratories, UK), which detects the anti-active caspase-3 (Promega, Madison, WI, USA, 1/1,000) and the Ki-67 protein (Dako, Glostrup, Denmark, 1/1,500), respectively. In accordance with the manufacturer's recommendations, sections were fixed in cold acetone for ten minutes, then rinsed twice for five minutes in buffered saline (Tris, pH 7.4) to be immunostained. The sites of cytoplasmic caspase-3 and nucleus Ki-67 immunoreactive antigens were detected on separated sections with DAB- H_2O_2 , which generated a brown color. Negative controls were run in parallel by replacing the primary antibody with non-immune immunoglobulins. Sections were then counterstained with hematoxylin and mounted with EUKITT mounting medium (O. Kindler

GmbH, Germany). To detect apoptotic and proliferative cells, respectively, the numbers of caspase-3 and Ki-67-positive cells were also determined as the mean of thirty fields ($\times 40$) per animal (six animals per group), as described above. The results were expressed as the number of labeled cells/ mm^2 .

RNA Isolation and Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

The mRNA expression of SGG sex hormone receptors (ER α , AR, PR) and growth factors (EGF, NGF, TGF α) was measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). Total RNA was extracted from submandibular glands using TRIzol Reagent (Invitrogen, France). The concentration and the integrity of total RNA were assessed with the Experion system (BioRad, France). cDNAs were synthesized using the iScript cDNA synthesis kit (BioRad) by using 50 ng total mRNA. Ribosomal protein S9 was used as an internal control. Primer sequences and qRT-PCR conditions are listed in Table 1. All oligonucleotide primers were designed using Beacon Designer 4.0 software (Bio-Rad Laboratories, Marne-La-Coquette, France). Amplification and detection of targeted and housekeeping genes were performed in duplicate for each animal (ten per group) using iQ SYBR Green Supermix (BioRad, France) on an iCycler MyiQ Single Color Real-Time Detection System (BioRad, France). The PCR program consisted of an initial denaturation at 95°C for thirty seconds, followed by forty PCR cycles: 95°C for five seconds, then 60°C for ten seconds. Amplification of specific transcripts was confirmed by melting-curve profiles generated at the end of the PCR program between 65°C and 95°C . The relative expression of transcripts was based on the following formula (Pfaffl 2001):

$$\text{Ratio} = [(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{target}}(\text{control}-\text{sample})}] / [(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{ref}}(\text{control}-\text{sample})}],$$

where E_{target} is the real-time PCR efficiency of a target gene transcript (90%–110%); E_{ref} is the real-time PCR efficiency of the reference gene transcript; cycle threshold (Ct) is the number of cycles required for the fluorescent signal to cross the threshold; $\Delta\text{Ct}_{\text{target}}$ is the Ct deviation of the control – sample for the target gene transcript; and $\Delta\text{Ct}_{\text{ref}} = \text{Ct deviation of control – sample for the reference gene transcript}$.

Statistical Analysis

For each group, the data were expressed as mean \pm SD. Statistical analyses were run using BMDP statistical software (Statistical Solutions Ltd, Cork, Ireland; Release 8.0, 2000). Comparison of the different parameters studied in the four exposure groups was made using standard one-way ANOVA. When appropriate, inter-group comparisons were performed using the Tukey test, and $p \leq .05$ was considered statistically significant. However, because of the relatively small size of the groups for some aspects of the study, a significance level of .10 is occasionally mentioned in the Results section.

TABLE 1.—Primers Used for Real-Time PCR Analysis

Genes	Primer Sequence (Forward and Reverse)	Amplicon Size (bp)	Hybridation Temperature (°C)
RPS9	5'-GCA AGC AGG TGG TGA ACA TTC C- 3' 5'-CCA TAA GGA GAA CGG AGG GAG AAG- 3'	85	60
ER α	5'-TCC AGC AGC AGC GAG AAG G- 3' 5'-GTC GTT ACA CAC AGC ACA GTA GC- 3'	75	60
ER β	5'-GAGGCAGAAAGTAGCCGGAA- 3' 5'-CGTGAGAAAAGAAGCATCAGGA- 3'	94	57
AR	5'-ACC ATA TCT GAC AGT GCC AAG GAG - 3' 5'-TCC AGT GCT TCC ACA CCC AAC- 3'	74	60
PR	5'-TGG TCT AAG TCT CTG CCT CTG CTC- 3' 5'-CCA TAA GGA GAA CGG AGG GAG AAG - 3'	186	60
EGF	5'-TTG AAA GGA TTT GCT GGC GAT GG- 3' 5'-TGG ACG AGG TGG GAG GAC GG- 3'	88	60
TGF α	5'-TCA CAG CAG CCA GTA CCA TCC - 3' 5'-ATG TCC AAC CAG ATT TGC CTC AAC - 3'	139	60
NGF	5'-TGA TCG GCG TAC AGG CAG AAC- 3' 5'-GCG GAG GGC TGT GTC AAG G- 3'	110	60

TABLE 2.—Effect of Gestational and Lactational Exposure to Genistein, Vinclozolin, and Genistein+Vinclozolin (1 mg/kg body weight) on Developmental Parameters (mean \pm SD) in Female Offspring

	Control	Genistein	Vinclozolin	Genistein+ Vinclozolin	ANOVA (F value; p value)
Pups/litter	10.6 \pm 0.8	11.3 \pm 1.0	11.1 \pm 1.0	12.7 \pm 1.0	NS
% female offspring (12 < n < 15)	48.9 \pm 17.8	48.5 \pm 16.3	46.2 \pm 22.9	56.5 \pm 22.8	NS
PND21 body weight (g) ^a	49.11 \pm 3.34	49.64 \pm 3.07 ^e	45.426 \pm 5.70 ^c	47.43 \pm 3.52 ^{d,e}	8.98; < .001
AGD (mm/g body weight) ^a	0.163 \pm 0.011	0.166 \pm 0.011 ^e	0.174 \pm 0.017 ^c	0.169 \pm 0.012 ^e	6.12; < .001
PND35 body weight (g) ^b	112.4 \pm 4.9	114.8 \pm 5.6	108.7 \pm 10	112.5 \pm 7.9	NS
PND35 SSG (g/100 g body weight) ^b	0.187 \pm 0.020	0.189 \pm 0.015	0.192 \pm 0.009	0.189 \pm 0.017	NS

Abbreviations: AGD, anogenital distance; PND, postnatal day; SSG, submandibular salivary gland.

^aBody weight and AGD measurement at weaning (PND21): n = 40 females per group.

^bDay of vaginal opening: n = 10 females per group, body weight and SSG weight: n = 10 females per group.

Values are expressed as mean \pm SD. The levels of difference in post-hoc pairwise comparisons (Tukey test) are indicated as follows

^cLevel of difference in post-hoc pairwise comparisons (Tukey test) vs control, $p < .01$.

^dLevel of difference in post-hoc pairwise comparisons (Tukey test) vs genistein, $p < .05$.

^eLevel of difference in post-hoc pairwise comparisons (Tukey test) vs vinclozolin, $p < .01$.

RESULTS

Effect on Food Consumption, Growth Rate, and Development

Daily exposure to 1 mg/kg BW of genistein and/or vinclozolin during the gestation/lactation period did not affect food and water intakes of dams and offspring (data not shown). These exposures also had no significant effect on the litter size, the sex ratio, or the pup BW at birth (Table 2). Nevertheless, using ANOVA, the BW at weaning (PND21) was significantly different among the four exposure groups ($F = 8.98$; $p < .001$). Post hoc tests revealed that animals exposed to vinclozolin had a lower body weight in comparison to the CTRL (-7.5%; $p < .01$), GEN (-8.5%, $p < .01$), and GEN+VIN (-4.2%; $p < .01$) groups, and female rats from the GEN group had a significantly higher BW than the GEN+VIN group females (+4.4%; $p < .05$). The relative AGD was also different among the four exposure treatments ($F = 6.16$, $p < .001$). Vinclozolin significantly increased the relative AGD in comparison to the controls (+ 6.7%; $p < .01$), as well as GEN (+ 4.6%; $p <$

.01), and GEN+VIN (+ 2.9%; $p < .05$; Table 2). ANOVA indicated that the onset of vaginal opening (VO; assessed on subsets of ten animals per group) tended to be different in the four exposure groups ($F = 2.35$, $p = .08$). Post hoc tests revealed a significantly earlier date of VO in the GEN+VIN group in comparison with the VIN group ($p < .01$), as shown in Figure 1. The BW and the SSG weights were not found to be significantly different among exposure groups at PND35 ($n = 10$; Table 2).

SSG Morphometry

Masson trichrome staining at PND35 indicated typical immature SSG in controls, with sero-mucous acini (pink-white), connective tissue (green), and striated ducts (red-pink) that differentiate into the granular convoluted tubules (GCT), a specific segment of adult SSG in rodents. In all rats, whether exposed to the chemicals separately (Figures 2B and 2C) or in mixture (Figure 2D), most of the striated ducts appeared wider and less frequent than in the controls (Figure 2A). This finding was confirmed by the ANOVA for both their number

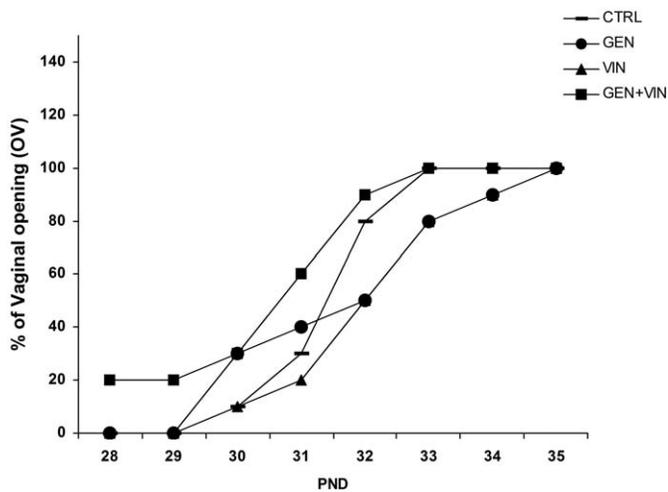


FIGURE 1.—Timing of vaginal opening in female rat offspring ($n = 10$) after gestational and lactational exposure to genistein (GEN), vinclozolin (VIN), or the mixture (GEN+VIN) at 1 mg/kg BW oral dose. Each point on the graph represents the cumulative percentage of rats with vaginal opening. ANOVA indicated a slight difference among the four groups ($F = 2.35$; $p = .08$).

($F = 21.38$; $p < .001$) and their area ($F = 25.14$; $p < .001$), and post hoc tests showed significantly lower numbers of striated ducts in the GEN group (-15.2% ; $p < .05$), the VIN group (-26.4% ; $p = .01$), and the mixture group (-41.1% ; $p < .01$) compared to the controls. The number of striated ducts in the animals exposed to genistein+vinclozolin was also significantly lower than in the animals exposed to genistein alone (-30.5% ; $p < .01$), and a tendency was noted with respect to vinclozolin alone (-19.9% ; $p = .1$; Figure 2E). As illustrated in Figure 2F, this decrease in the number of striated ducts was associated with a significant increase in their area in the animals from the VIN ($+23.2\%$) and GEN+VIN groups ($+21.7\%$), and to a lesser extent the GEN group ($+13.4\%$) in comparison to the controls ($p < .01$).

Assessment of Cell Proliferation and Apoptosis

At PND35, the caspase 3 protein was not expressed in SSG of controls nor in those of any treated rats (data not shown). In contrast, Ki-67 positive cells (dark brown nuclei) were seen, especially in the acini (Figure 3A-D), and the number of positive nuclei was significantly different among exposure groups ($F = 8.20$; $p = .001$). The number of Ki-67-positive nuclei was lower in both vinclozolin- and genistein+vinclozolin-exposed rats compared to CTRL rats (-23.8% , $p < .05$ and -33.5% , $p < .01$, respectively). The number of Ki-67-positive nuclei cells tended to be higher in the GEN group than in the mixture group ($+14.6\%$; $p < .1$; Figure 3E).

Expression of Sex Hormone Receptors and Endocrine Growth Factors

At PND35, sex steroid receptor transcripts were differently expressed in the SSG from control group animals; AR was the

most abundant sex steroid receptor transcript ($Ct = 26$) in comparison to $ER\alpha$ ($Ct = 30$) and PR ($Ct = 29$), and $ER\beta$ transcripts were not detected ($Ct > 36$), although the β primer used was fully efficient for detecting $ER\beta$ transcripts in a control uterine sample ($Ct = 25$; data not shown). The levels of sex hormone receptor transcripts were not greatly affected by the treatments (Figures 4A-4C). We found only a tendency for AR ($F = 2.24$, $p = .1$), and expression tended to be lower in the GEN+VIN group in comparison to the GEN group ($p < .1$). In addition, among the four treatments, the AR expression profiles tended to be similar to those of PR. ANOVA showed significant variation in PR mRNA expression among the four groups ($F = 5.53$; $p = .003$). PR transcripts tended to be lower in the GEN+VIN group in comparison to CTRL group (-40.8% ; $p < 0.1$), but the difference was more pronounced in comparison to the groups treated with the compounds alone (GEN: -51.2% , $p < .01$; VIN: -45.0% , $p < .05$).

At PND35, the EGF growth factor transcripts were highly expressed in the CTRL SSG of the unexposed animals ($Ct = 22$), whereas $TGF\alpha$ and NGF mRNAs were less expressed ($Ct = 33$ and $Ct = 29$, respectively). The mean level of the EGF expression was significantly different in the four groups ($F = 4.84$; $p = 0.0011$; Figure 4D), as were the expression levels of NGF ($F = 11.23$; $p = 10^{-4}$; Figure 4E). Post hoc pairwise comparisons showed that none of the studied growth factors was significantly affected by genistein exposure. In contrast, they were all similarly less expressed in the VIN- and GEN+VIN-exposed rats and this result was more strongly pronounced for the mixture, in comparison to the levels found in the controls (EGF: -53.9% , $p < .05$; $TGF\alpha$: $-45.8.8\%$ and NGF : -43.1% ; $p < .01$).

Taken together, our results show that both morphogenesis of SSGs and mRNA expression of the related endocrine growth factors in the SSG of female rats were more affected by the mixture of xeno-hormones than by the compounds alone, and that the glands were more affected by vinclozolin than genistein.

DISCUSSION

This study provides new evidence that SSG could be targeted by steroid-like xenobiotics, as suggested by several previous reports (Carvalho et al. 2011; De Rijk et al. 2003; Sakabe et al. 2000), and it gives the first evidence that relatively low doses of estrogenic and anti-androgenic dietary endocrine disruptors are capable of disrupting the development and secretions of SSG in immature female rats. Interestingly, exposure to genistein+vinclozolin strongly increased normal differentiation of striated ducts into GCT but decreased the mRNA expression of endocrine biologically active peptides (i.e., EGF and NGF), whereas sex-dependant biomarkers were weakly affected. This increase in the effect of exposure to the genistein+vinclozolin mixture compared with exposure to each compound alone is reminiscent of our previous results reported for the female mammary gland by El Sheikh Saad

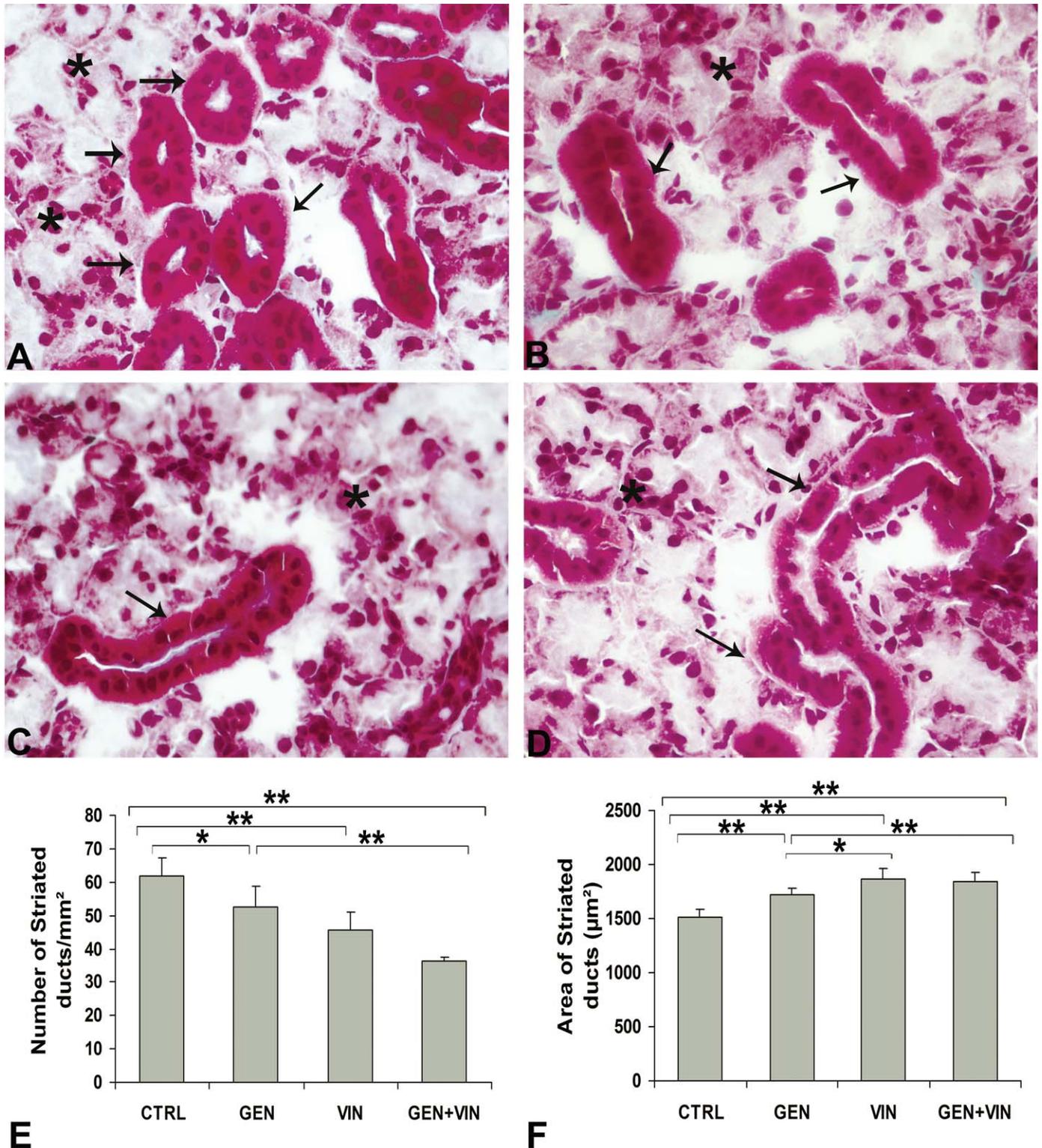


FIGURE 2.—Submandibular salivary gland histology and morphometric results in female rat offspring at PND35 after gestational and lactational exposure to 1 mg/kg body weight per day of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and their mixture (GEN+VIN). Representative photomicrographs of Masson's trichrome-stained sections (5- μ m sections, \times 400 final magnification). Sero-mucous acini are indicated by stars and striated ducts by arrows. The female CTRL (A) group SSG had normal-sized striated ducts, whereas the SSG in the female GEN (B), VIN (C), and GEN+VIN (D) groups had larger striated ducts. The number of striated ducts per mm² (E) and the area of striated ducts expressed in μ m² (F) are represented as the mean value \pm SD for each group (n = 6). Intergroup differences (Tukeys test) are indicated by the following symbols: ** $p < .01$; * $p < .05$.

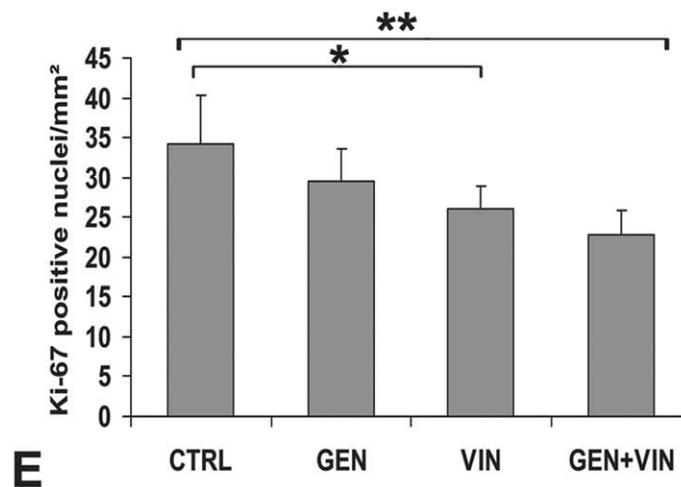
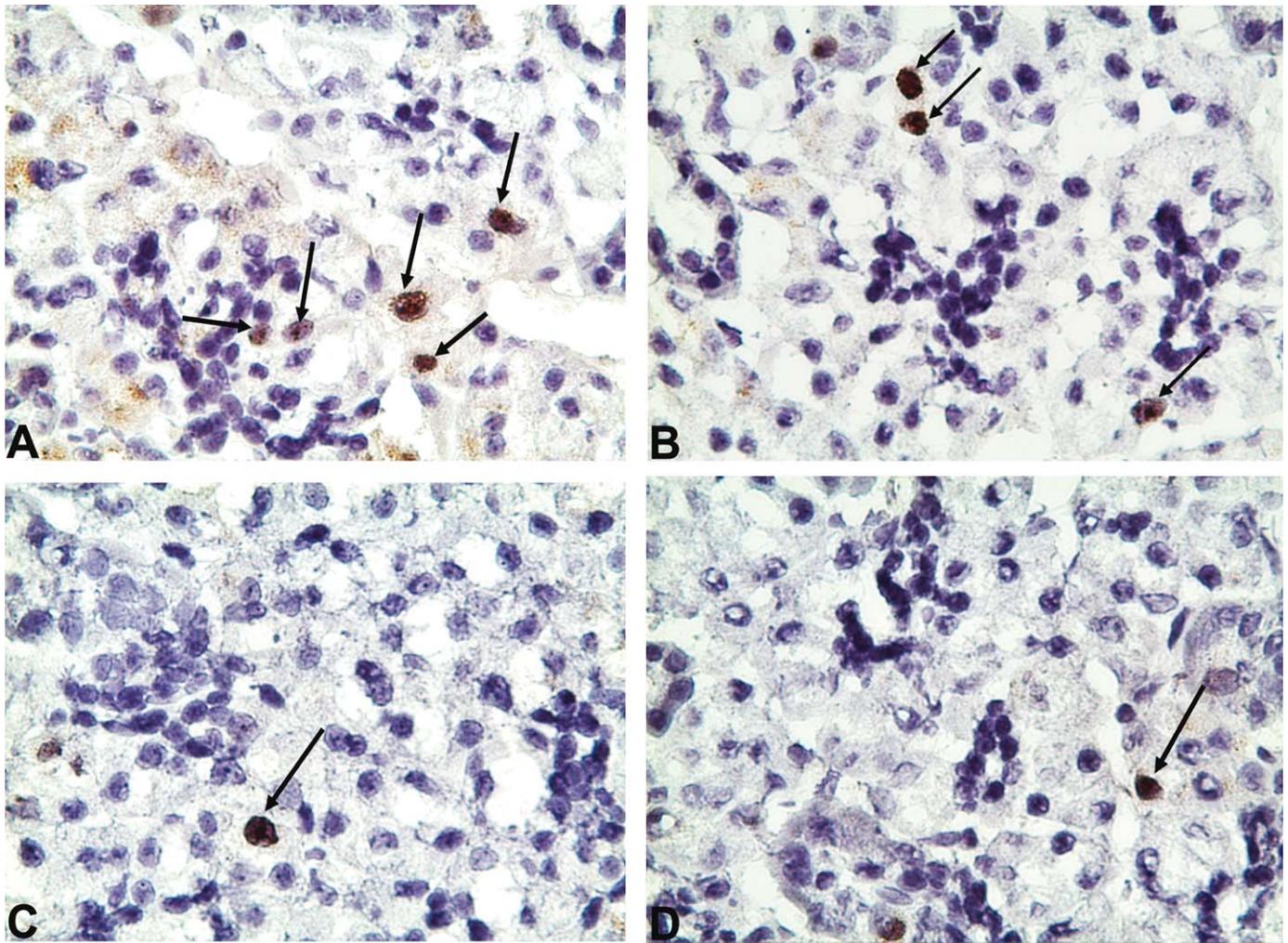


FIGURE 3.—Proliferation of submandibular salivary glands in PND35 female rat offspring after gestation-lactation exposure to 1 mg/kg body weight of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and the mixture (GEN+VIN). Immunohistochemical photomicrographs of Ki-67 ($\times 400$) expression in submandibular salivary gland (SSG) sections. The Ki-67–positive cells have brown-stained nuclei. Note the presence of numerous Ki-67–positive nuclei (arrows) in the CTRL group (A) and the presence of rare mitotic nuclei in the GEN- (B), VIN- (C), and GEN+VIN- (D) treated groups for these sections. The number of Ki-67–positive nuclei decreases in the VIN and GEN+VIN groups (E). Values are expressed as mean \pm SD per mm² (n = 6). Different intergroup values (Tukey test) are indicated by the following symbols: ** $p < .01$; * $p < .05$.

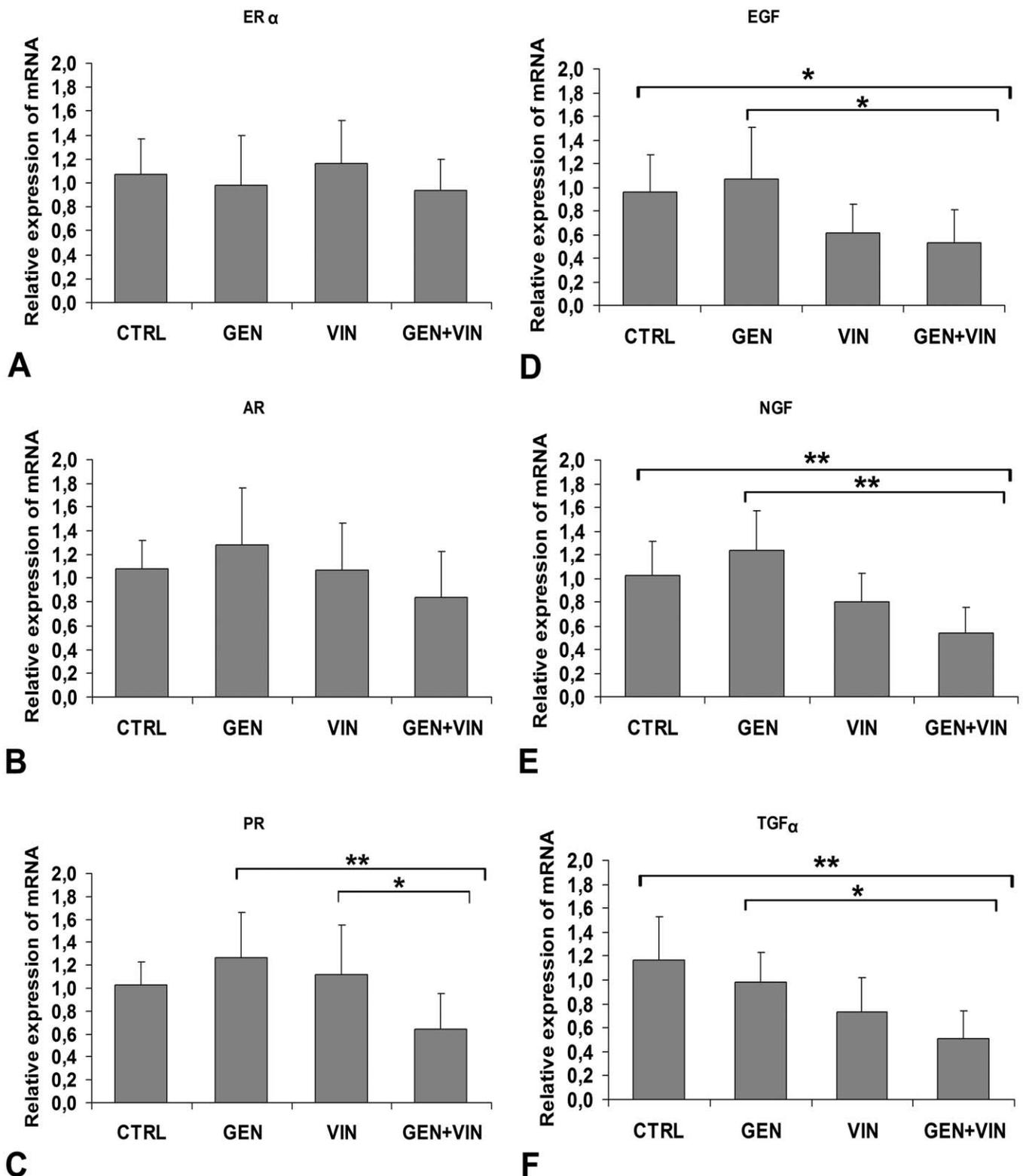


FIGURE 4.—Effect of gestational and lactational exposure to 1 mg/kg body weight of genistein (GEN), vinclozolin (VIN), and the mixture (GEN + VIN) on the mRNA expression of sex hormone receptors (A, B, C) and growth factors (D, E, F) in the submandibular salivary gland of female rats at postnatal day 35 using a real-time PCR method. Values are mean \pm SD ($n = 10$). Intergroup differences (Tukey test) are indicated by the following symbols: ** $p < .01$; * $p < .05$.

et al. (2011) as well as for male reproductive organs (Eustache et al. 2009), two other studies based on a similar exposure protocol. Overall, these results give supplementary data to argue that the effect of a perinatal exposure to genistein and/or vinclozolin on developmental programming of the SSG could be linked to sex hormone-dependent disorders.

Comparing AGD and the time of VO suggests that early exposure to genistein and vinclozolin did not greatly affect sex hormones at the 1 mg/kg daily dose. Nevertheless, early exposure to vinclozolin led to some female virilization, as shown by AGD at PND21, suggesting a predominantly androgenic effect, which was previously reported for the female reproductive tract (Buckley et al. 2006). This apparent discrepancy could be the result of the androgen agonist activities of the M2 vinclozolin metabolites (Molina-Molina et al. 2006; Wong et al. 1995), since a complementary study indicated that M2 metabolite, but not vinclozolin, was recovered in the plasma and milk of lactating mothers (Auger et al. 2010). In contrast, because of a specific estrogen-like response, the time of VO was not affected by vinclozolin alone, as it was by anti-androgenic compounds (Matsuura et al. 2005; Mylchreest et al. 1998), whereas estrogenicity mediated by genistein was increased by concomitant exposure to vinclozolin, provoking slight estrogenic modifications at the onset of puberty. Overall, our results showing endocrine effects on AGD and time of VO, coupled with our previous finding concerning the female mammary gland (El Sheikh Saad et al. 2011) and male reproductive organs (Eustache et al. 2009; Lehraiki et al. 2011), led us to speculate that these molecules could produce different and significant sex hormone-like effects at low doses, alone or in mixture, depending on the sex-dependent target. Consequently, because of sensitivity to genistein and vinclozolin exposure, SSG may be considered as an endocrine disruptor target for natural and synthetic xeno-hormones.

Similar to the mammary glands, salivary gland development is regulated by both estrogen and androgen, and maturity is reached at puberty (Gresik 1980). Sexual dimorphism of SSG, resulting in larger granular convoluted tubules in males compared to females (Rins de David et al. 1990), is observed in adult as well as in immature rodents (White and Mudd 1975). Estrogens and androgens are both involved in SSG postnatal morphogenesis, acting on the differentiation of proacini into mature acini and on the development of striated ducts that are the precursors of GCT cells in adult SSG (Jacoby and Leeson 1959). By six weeks of age (i.e., when the mammary gland reaches maturity), striated ducts decrease in size and become highly convoluted to further differentiate the GCTs (Gresik 1980).

In our study, because SSG morphogenesis was in process at PND35; striated ducts were less abundant than acini, as also previously reported (White and Mudd 1975); and the caspase-3 apoptose biomarker, which is highly expressed in PND21 SSG, normally disappeared at PND35 as a result of the normal decrease of apoptosis (Hayashi et al. 2000).

Interestingly, genistein and vinclozolin acted similarly on immature female SSG development, decreasing the numbers of striated ducts and increasing their areas, and their combined exposure had a cumulative effect. The decrease in the number of striated ducts was coupled with a concomitant decrease of the Ki-67 proliferative marker. This decrease was particularly expressed in the GEN+VIN group. It was reminiscent of disorders in the maturation of the prepubertal salivary gland, confirming a disturbance in SSG development that seems to appear as a sex hormone-dependent response.

Submandibular salivary gland morphogenesis was similarly disrupted by genistein and vinclozolin, decreasing the numbers of striated ducts and increasing their areas, as estradiol does to adult submandibular GCTs (Flynn et al. 1983). Moreover, as an anti-androgenic response, a study in which male rats were castrated (Miyaji et al. 2008) found sexual dimorphism of SSGs abolished by decreasing both the number and area of GCTs. As a consequence, the histological aspect of SSG became similar to that of normal females, but in our study, vinclozolin did not decrease the area of striated ducts, suggesting a non-anti-androgenic effect of vinclozolin exposure. However, in young mice, neonatal castration abolished sexual dimorphism, and neonatal sex hormone substitutions showed the main involvement of testosterone, but not 17- β estradiol, in GCT development in both male and female SSG (Sawada and Noumura 1991). The functionality of both estrogen and androgen in female SSG development remains unclear, since estradiol, like androgens, could increase adult GCT areas in the case of high chronic 25 mg estradiol exposure (Flynn et al. 1983). In the same way, the synthetic estrogen-like compound Estren produced androgen-like effects on SSG morphology in ovariectomized adult female mice as well as in DERKO mice, indicating an independent ER pathway (Islander et al. 2005). These data support the hypothesis that female SSG could be sensitive to both estrogenic and anti-androgenic chemicals through the AR pathway. In addition, because uterine and lactational exposure to vinclozolin gives rise to two main metabolites (M1 and M2) that have a high affinity for the AR and to a lesser extent the ER (Molina-Molina et al. 2006; Wong et al. 1995), and since androgens stimulate perinatal GCT development in both male and female adult rats (Sawada and Nomura 1991), our results could also reveal an androgenic response to vinclozolin. This hypothesis could explain the additive effect of the exposure to the genistein+vinclozolin mixture and the similar histologic defects observed in genistein and vinclozolin-treated rats.

In addition, our finding of stronger expression of AR than ER α in SSG of immature female rats and our failure to detect ER β suggests a greater susceptibility of SSG development to androgen and anti-androgen chemicals than to estrogenic compounds. This must be considered as a consistent result indicating SSG as a singular AR-regulated organ in females.

Granular convoluted tubule maturation is strongly linked to growth factor secretions. Both TGF α and EGF are ligands of

the EGF receptor that is involved in the regulation of branching morphogenesis, and growth factor secretions change with age. However, TGF α is highly secreted at birth and decreases over time, becoming very low at thirty-five days of age (Moji et al. 1995), and EGF and NGF secretions increase exponentially until 50 days of age, that is, when estrogenic and androgenic pubertal signals are taking place and GCTs reach maturity (Gresik 1980; Mogi et al. 1995). In our study, NGF and TGF- α were poorly expressed in the SSG of the control animals, confirming that maturation was approaching. Surprisingly, we found no effect of genistein on EGF, NGF, or TGF α mRNA expression, although estrogen greatly down-regulated EGF mRNA expression in SSG of adult ovariectomized mice (Tuomela et al. 1990). This lack of effect on growth factors could be a result both to the weak expression of ERs in the SSG of PND35 female rats and to the window and dose of exposure (gestation/lactation – 1mg/kg BW), since a three-day prepubertal exposure to 500mg/kg BW TEN down-regulated EGF mRNA expression in the mammary gland of fifty-day-old female rats (Brown et al. 1998).

As an anti-androgenic response, GCT areas as well as EGF and NGF expression in SSG were decreased by castration of male rodents (Hiramatsu et al. 1994; Humpel et al. 1993). In our study, despite an increase in the GCT areas, vinclozolin alone as well as the genistein+vinclozolin mixture strongly decreased TGF α and EGF/NGF expression, indicating a specific anti-androgenic action on all three growth factor mRNA transcripts by vinclozolin or its metabolites. In addition, androgens are self-produced by SSGs (Katsukawa et al. 1983). There might also be inhibition of 5 α -reductase by vinclozolin or its metabolites; our previous findings suggested this hypothesis, since in the neonatal testis, similar exposure to vinclozolin and genistein+vinclozolin inhibited the production of hydroxytestosterone, whereas genistein did not (Lehraiki et al. 2011).

Our findings reveal that the increase observed in the areas of immature GCT (striated ducts) is not linked to an increase in their secretions. Whereas the striated ducts could be enlarged as an effect of targeted morphogenesis, the reduced EGF and NGF mRNA levels in treated groups could reflect a response of the submandibular secretion process, probably by an independent mechanism. Such a hypothesis about independent regulation pathways in development and in the secretion process has already been proposed by Siminoski et al. (1993), who have shown that NGF and EGF secretions are controlled by a similar molecular mechanism that is independent of the growth of GCT cells. Therefore, we suggest that in our conditions, genistein and vinclozolin could affect growth factor synthesis and GCT morphogenesis by independent pathways. This suggestion could be supported by the fact that an early exposure to low doses of genistein/vinclozolin mixture in the testis has been shown to act specifically on gene clusters that are not affected by the chemicals alone at the same low dose (Eustache et al. 2009).

Thus, the similar decrease in TGF α and EGF/NGF expression in the present study indicates a specific anti-androgenic action of vinclozolin, whereas the similar effect of genistein

and vinclozolin on the enlargement of striated ducts appears as an estrogen-like effect on morphogenesis, as also observed in the male reproductive tract.

In summary, this study reveals for the first time the morphogenic and endocrine impacts of gestational and lactational exposure of dams to endocrine disruptors on the SSG development of female offspring and underlines the additive or synergic effects of estrogen-antiandrogen EDC mixtures. These findings were obtained for a low dose of genistein, close to normal human dietary exposure, and for a low dose of vinclozolin, below the NOAEL but notably higher than estimated levels in humans. Since SSGs are the major source of circulating EGF, this repression of EGF may be predictive of a disturbance later in adulthood. In this way, several studies using sialoadenectomy have demonstrated the role of SSG in the development of the mammary glands and lactation, in the development of the female reproductive tract, and in oral and systemic health. However, new investigations are needed to describe the effect of endocrine disruptors on the differentiation mechanisms and signaling pathways of the SSG. Moreover, because of the higher sensitivity of males than females to estrogenic and anti-androgenic-like chemicals, we are now investigating the effects of the same exposure morphology and functions of male SSGs.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to Laurence Decocq, Patrick Tassin, and Luc Pérépelkine for their technical assistance in the animal facility at INRA Dijon; to Anne Hillenweck (INRA Toulouse) for preparing and providing vinclozolin; to Claire Chabanet for statistical assistance; to Richard Gunton for English revision; and to Pr. Y. Artur for discussions.

REFERENCES

- Actis, A. B. (2005). A hypothesis to relate salivary tumors with mammary and prostate neoplasias. *Bioinformation* **1**, 12–13.
- AFSSA-AFSSAPS. (2005). The safety and benefits of dietary phytoestrogens – Recommendations. AFSSA, AFSSAPS, editors. Maisons-Alfort, Saint-Denis (France). <http://www.afssa.fr/Documents/NUT-Ra-Phytoestrogenes.pdf>.
- Auger, J., Canivenc-Lavier, M. C., Perrot-Applanat, M., Habert, R., Savouret, J.-F., Cravedi, J. P. (2010). Gestational and postnatal exposures to dietary low doses of genistein and/or vinclozolin in rodents: Effects at different developmental steps, modes of action, compounds fate and biotransformation in various organs and tissues. [abstract]. Colloque PNR-PE. April 12, 2010, Rennes, France. http://pnrpe.fr/IMG/pdf/Resume_Auger_Anglais.pdf
- Boyer, R., Jame, F., and Arancibia, S. (1991). A non-exocrine function of the submaxillary gland [article in French]. *Ann Endocrinol (Paris)* **52**, 307–22.
- Brown, N. M., Wang, J., Cotroneo, M. S., Zhao, Y. X., and Lamartiniere, C. A. (1998). Prepubertal genistein treatment modulates TGF- α , EGF and EGF-receptor mRNAs and proteins in the rat mammary gland. *Mol Cell Endocrinol* **144**, 149–65.
- Buckley, J., Willingham, E., Agras, K., and Baskin, L. S. (2006). Embryonic exposure to the fungicide vinclozolin causes virilization of females and alteration of progesterone receptor expression in vivo: an experimental study in mice. *Environ Health* **5**, 4.
- Bursztyka, J., Debrauwer, L., Perdu, E., Jouanin, I., Jaeg, J. P., and Cravedi, J. P. (2008). Biotransformation of vinclozolin in rat precision-cut liver slices:

- comparison with in vivo metabolic pattern. *J Agric Food Chem* **56**, 4832–39.
- Campbell, P. S., Ben-Aryeh, H., and Swanson, K. A. (1990). Differential distribution of an estrogen receptor in the submandibular and parotid salivary glands of female rats. *Endocr Res* **16**, 333–45.
- Carvalho, V. D., Silveira, V. A., do Prado, R. F., and Carvalho, Y. R. (2011). Effect of estrogen therapy, soy isoflavones, and the combination therapy on the submandibular gland of ovariectomized rats. *Pathol Res Pract* **207**, 300–5.
- De Rijk, E. P., Ravesloot, W. T., Hafmans, T. G., and van Esch, E. (2003). Multifocal ductal cell hyperplasia in the submandibular salivary glands of Wistar rats chronically treated with a novel steroidal compound. *Toxicol Pathol* **31**, 1–9.
- El Sheikh Saad, H., Meduri, G., Phrakonkham, P., Berges, R., Vacher, S., Djallali, M., Auger, J., Canivenc-Lavier, M. C., and Perrot-Applanat, M. (2011). Abnormal peripubertal development of the rat mammary gland following exposure in utero and during lactation to a mixture of genistein and the food contaminant vinclozolin. *Reprod Toxicol* **32**, 15–25.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2010). 2008 Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal* **8**, 1646. doi:10.2903/j.efsa.
- Eustache, F., Mondon, F., Canivenc-Lavier, M. C., Lesaffre, C., Fulla, Y., Berges, R., Cravedi, J. P., Vaiman, D., and Auger, J. (2009). Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environ Health Perspect* **117**, 1272–79.
- Flynn, E. A., Yelland, K. T., and Shklar, G. (1983). Effect of estradiol on ultrastructure of granular ducts in submandibular glands of female rats. *Anat Rec* **206**, 23–30.
- Gresik, E. W. (1980). Postnatal developmental changes in submandibular glands of rats and mice. *J Histochem Cytochem* **28**, 860–70.
- Hayashi, H., Ozono, S., Watanabe, K., Nagatsu, I., and Onozuka, M. (2000). Morphological aspects of the postnatal development of submandibular glands in male rats: involvement of apoptosis. *J Histochem Cytochem* **48**, 695–98.
- Hiramatsu, M., Kashimata, M., Takayama, F., and Minami, N. (1994). Developmental changes in and hormonal modulation of epidermal growth factor concentration in the rat submandibular gland. *J Endocrinol* **140**, 357–63.
- Houssay, A. B., and de Harfin, J. F. (1973). Effects of estrogens on submaxillary glands in mice. *J Dent Res* **52**, 1051–53.
- Humpel, C., Lindqvist, E., and Olson, L. (1993). Detection of nerve growth factor mRNA in rodent salivary glands with digoxigenin- and 33P-labeled oligonucleotides: effects of castration and sympathectomy. *J Histochem Cytochem* **41**, 703–8.
- Hwang, D. L., Wang, S., Chen, R. C., and Lev-Ran, A. (1991). Trauma, especially of the submandibular glands, causes release of epidermal growth factor into bloodstream in mice. *Regul Pept* **34**, 133–39.
- Islander, U., Housseus, B., Erlandsson, M. C., Jochems, C., Skrtic, S. M., Lindberg, M., Gustafsson, J. A., Ohlsson, C., and Carlsten, H. (2005). Estren promotes androgen phenotypes in primary lymphoid organs and submandibular glands. *BMC Immunol* **6**, 16.
- Jacoby, F., and Leeson, C. R. (1959). The postnatal development of the rat submaxillary gland. *J Anat* **93**, 201–16.
- Katsukawa, H., Tanabe, Y., and Funakoshi, M. (1983). Effects of androgens on the activity of steroid-metabolizing enzymes in the murine submaxillary gland. *J Dent Res* **62**, 725–27.
- Laine, M., and Leimola-Virtanen, R. (1996). Effect of hormone replacement therapy on salivary flow rate, buffer effect and pH on perimenopausal and postmenopausal women. *Arch Oral Biol* **41**, 91–96.
- Lehraiki, A., Messiaen, S., Berges, R., Canivenc-Lavier, M. C., Auger, J., Habert, R., and Levacher, C. (2011). Antagonistic effects of gestational dietary exposure to low-dose vinclozolin and genistein on rat fetal germ cell development. *Reprod Toxicol* **31**, 424–30.
- Mathison, R. (1995). The Submandibular Glands: a role in homeostasis and allostasis. *Biomed Rev* **4**, 61–69.
- Matsuura, I., Saitoh, T., Ashina, M., Wako, Y., Iwata, H., Toyota, N., Ishizuka, Y., Namiki, M., Hoshino, N., and Tsuchitani, M. (2005). Evaluation of a two-generation reproduction toxicity study adding endpoints to detect endocrine disrupting activity using vinclozolin. *J Toxicol Sci* **30** Spec No., 163–88.
- Miyaji, Y., Aiyama, S., and Kurabuchi, S. (2008). Strain-specific and endocrine control of granular convoluted tubule cells and epidermal growth factor expression in the mouse submandibular gland. *Anat Rec (Hoboken)* **291**, 105–13.
- Mogi, M., Matsuura, S., Suzuki, K., Inagaki, H., Minami, M., Kojima, K., and Harada, M. (1995). Differential expression of transforming growth factor- α and epidermal growth factor during postnatal development of rat submandibular gland. *Biochem Biophys Res Commun* **217**, 271–77.
- Molina-Molina, J. M., Hillenweck, A., Jouanin, I., Zalko, D., Cravedi, J. P., Fernandez, M. F., Pillon, A., Nicolas, J. C., Olea, N., and Balaguer, P. (2006). Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* **216**, 44–54.
- Morris-Wiman, J., Segó, R., Brinkley, L., and Dolce, C. (2000). The effects of sialoadenectomy and exogenous EGF on taste bud morphology and maintenance. *Chem Senses* **25**, 9–19.
- Mylchreest, E., Cattley, R. C., and Foster, P. M. (1998). Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to Di(n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol Sci* **43**, 47–60.
- Ozono, S., Onozuka, M., Sato, K., and Ito, Y. (1991). Immunohistochemical evidence for the presence of progesterone receptor in rat submandibular glands. *Cell Struct Funct* **16**, 511–13.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Porola, P., Laine, M., Virkki, L., Poduval, P., and Konttinen, Y. T. (2007). The influence of sex steroids on Sjogren's syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **1108**, 426–32.
- Rins de David, M. L., Caceres, A., and Goldraij, A. (1990). Sexual dimorphism in rat submaxillary gland [article in Spanish]. *Acta Odontol Latinoam* **5**, 63–9.
- Rougeot, C., Rosinski-Chupin, I., Mathison, R., and Rougeon, F. (2000). Rodent submandibular gland peptide hormones and other biologically active peptides. *Peptides* **21**, 443–55.
- Sakabe, K., Onoe, M., Okuma, M., Yoshida, T., Aikawa, H., Kinoue, T., and Kayama, F. (2000). Natural and environmental oestrogens increase expression of SS-A/Ro autoantigen in the salivary gland of ovariectomized immature rats. *Pathophysiology* **6**, 231–36.
- Saruta, J., Sato, S., and Tsukinoki, K. (2010). The role of neurotrophins related to stress in saliva and salivary glands. *Histol Histopathol* **25**, 1317–30.
- Sawada, K., and Noumura, T. (1991). Effects of castration and sex steroids on sexually dimorphic development of the mouse submandibular gland. *Acta Anat (Basel)* **140**, 97–103.
- Siminoski, K., Bernanke, J., and Murphy, R. A. (1993). Nerve growth factor and epidermal growth factor in mouse submandibular glands: identical diurnal changes and rates of secretagogue-induced synthesis. *Endocrinology* **132**, 2031–37.
- Stroheker, T., Chagnon, M. C., Pinnert, M. F., Berges, R., and Canivenc-Lavier, M. C. (2003). Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reprod Toxicol* **17**, 421–32.
- Suzuki, Y., Mizoguchi, I., and Uchida, N. (2007). Detection of neurotrophic factors in taste buds by laser capture microdissection, immunohistochemistry, and in situ hybridization. *Arch Histol Cytol* **70**, 117–26.
- Treister, N. S., Richards, S. M., Suzuki, T., Jensen, R. V., and Sullivan, D. A. (2005). Influence of androgens on gene expression in the BALB/c mouse submandibular gland. *J Dent Res* **84**, 1187–92.
- Tuomela, T., Miettinen, P., Pesonen, K., Viinikka, L., and Perheentupa, J. (1990). Epidermal growth factor in mice: effects of estradiol, testosterone and dexamethasone. *Acta Endocrinol (Copenh)* **123**, 211–17.

- United States Environmental Protection Agency (EPA) (2003). Vinclozolin; notice of filing a pesticide petition to establish a tolerance for a certain pesticide chemical in or on food. *Fed Reg* **68**, 14628–35.
- White, S. C., and Mudd, B. D. (1975). Hormonal regulation of submandibular salivary gland morphology and antigenicity in rats. *Arch Oral Biol* **20**, 871–75.
- Wong, C., Kelce, W. R., Sar, M., and Wilson, E. M. (1995). Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J Biol Chem* **270**, 19998–20003.
- Xu, Q. L. (2003). [The localization and potential function of androgen receptor mRNA in rat submaxillary]. *Zhonghua Nan Ke Xue* **9**, 681–83.
-

For reprints and permissions queries, please visit SAGE's Web site at <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>.

1.2.1.1. Croissance et développement corporel

Tout comme précédemment, l'exposition quotidienne à 1mg/kg pc en génistéine et/ou vinclozoline pendant la gestation et la lactation n'a pas eu d'effet significatif sur le nombre de portée, le sex- ratio ou sur le poids corporel des nouveau-nés. Elle n'a pas non plus affecté la prise alimentaire, ni la consommation en eau des femelles à J35. On a noté cependant une différence significative entre les 4 groupes relative au poids corporel des femelles au sevrage à J21 (ANOVA, $p < 0.05$) avec un poids significativement plus faible chez les animaux traités à la vinclozoline par rapport à celui des animaux des groupes CTRL (-7.5%; $p < 0.01$), GEN (-8.5%, $p < 0.01$), et GEN+VIN (-4.2%; $p < 0.01$). Il existe aussi une différence significative parmi les 4 groupes concernant la distance anogénitale (ANOVA, $p < 0.001$). La vinclozoline augmente de façon significative la DAG par rapport au CTRL (+6.7%; $p < 0.01$), GEN (+4.6%; $p < 0.01$), et GEN+VIN (+2.9%; $p < 0.05$). (Kouidhi et al., 2012 ; tableau 1)

L'ouverture vaginale se trouve avancée chez les animaux du groupe mélange GEN+VIN par rapport au groupe VIN ($p < 0.01$). Le poids corporel et les poids des glandes SM des femelles J35 ne sont pas significativement différents entre les quatre groupes (Kouidhi et al 2012 ; figure 1)

1.2.1.2. Morphométrie de la glande SM

La coloration au Trichrome de Masson au stade à J35 révèle la présence d'acini séro-muqueux (colorés en blanc et rose), du tissu conjonctif (en vert), et des canaux striés (en rose foncé). Ces derniers sont en fait les précurseurs des tubules granulaires contournés (GCT), des segments spécifiques de la glande SM chez les rongeurs adultes. Chez tous les rats, qu'ils soient exposés aux molécules seules ou en mélanges, les canaux striés apparaissent plus larges et moins fréquents que chez les animaux contrôles (Kouidhi et al., 2012 ; figure 2A). Ceci est confirmé par le comptage et l'analyse statistique du nombre de canaux striés (ANOVA, $p < 0.001$) et de leurs aires (ANOVA, $p < 0.001$), avec un nombre beaucoup plus faible des canaux striés au niveau des groupes GEN (-15.2%; $p < 0.05$), VIN (-26.4%; $p < 0.01$), et du groupe mélange (-41.1%; $p < 0.01$) comparés au groupe contrôle. Cette diminution du nombre des canaux striés est accompagnée d'une augmentation significative de leurs aires au niveau des groupes VIN (+23.2%) et GEN+VIN (+21.7%), et à un effet moindre, au niveau du groupe GEN (+13.4%) par rapport au groupe CTRL ($p < 0.01$). (Kouidhi et al., 2012 ; figure 2B).

1.2.1.3. Prolifération cellulaire

Au stade J35, chez les témoins, on observe peu de cellules marquées au Ki-67 (noyaux marrons foncé), et ils sont spécialement localisés au niveau des acini. Chez les animaux traités le nombre de noyaux Ki-67 positifs est moins élevé au niveau des SM des animaux exposés à la vinclozoline ou exposés au mélange GEN+VIN comparés aux animaux du groupe CTRL (respectivement : -23.8%, $p < 0.05$ et -33.5%, $p < 0.01$). (Kouidhi et al., 2012 ; figure 3)

1.2.1.4. Expression des ARNm codant pour les récepteurs hormonaux et les facteurs de croissance

Chez les femelles immatures, les ARNm des récepteurs des hormones sexuelles sont exprimés également à des degrés différents au niveau de la glande SM des animaux CTRL ; le AR est le plus abondant (avec un nombre de cycle Ct = 26) en comparaison avec le ER α (Ct = 30) et avec le PR (Ct = 29), le ER β quant à lui n'est pas détecté (Ct > 36). L'expression des récepteurs hormonaux ne se trouve pas considérablement affectée par les traitements (Kouidhi et al., 2012 ; Figure 4A). On trouve seulement une tendance une plus forte expression pour le AR dans le lot Génistéine (ANOVA, $p < 0.1$). L'expression du PR quant à elle est différente entre les 4 groupes (ANOVA, $p < 0.003$) avec une tendance de diminution au niveau du groupe GEN+VIN par rapport au groupe CTRL (- 40.8%; $p < 0.1$), mais la différence est plus prononcée par rapport aux groupes traités avec les molécules seules (GEN: 51.2%, $p < 0.01$; VIN: - 45.0%, $p < 0.05$).

1.2.1.5. Expression des ARNm codant pour les facteurs de croissance

A ce stade, les ARNm du facteur de croissance EGF sont bien exprimés au niveau des glandes SM des animaux CTRL (Ct = 22), par rapport aux ARNm du TGF α et du NGF (respectivement : Ct = 33 et Ct = 29). L'expression relative de l'EGF est significativement différente entre les quatre groupes (ANOVA, $p < 0.001$), tout comme pour le NGF et le TGF α (ANOVA, $p < 0.001$). L'expression de tous les facteurs de croissance n'est pas affectée par la génistéine. Par contre, ils sont tous moins exprimés dans le groupes VIN et cette diminution est beaucoup plus prononcée au niveau du groupe GEN+VIN (EGF: -53.9%, $p < 0.05$; TGF α : -45.8.8% et NGF:-43.1%; $p < 0.01$). (Kouidhi et al., 2012 ; Figure 4B).

1.2.2. Résultats complémentaires (non présentés au niveau de la publication)

1.2.2.1. Préférence au sucré

Le test de préférence à la solution de saccharine a également été effectué au moment du sevrage chez les femelles, mais il n'a révélé aucune différence significative entre les différents groupes, tant au niveau de la quantité de saccharine consommée que pour la consommation d'eau ; en conséquence, aucun effet n'a été observé au niveau de la préférence à la saccharine (Figure 45).

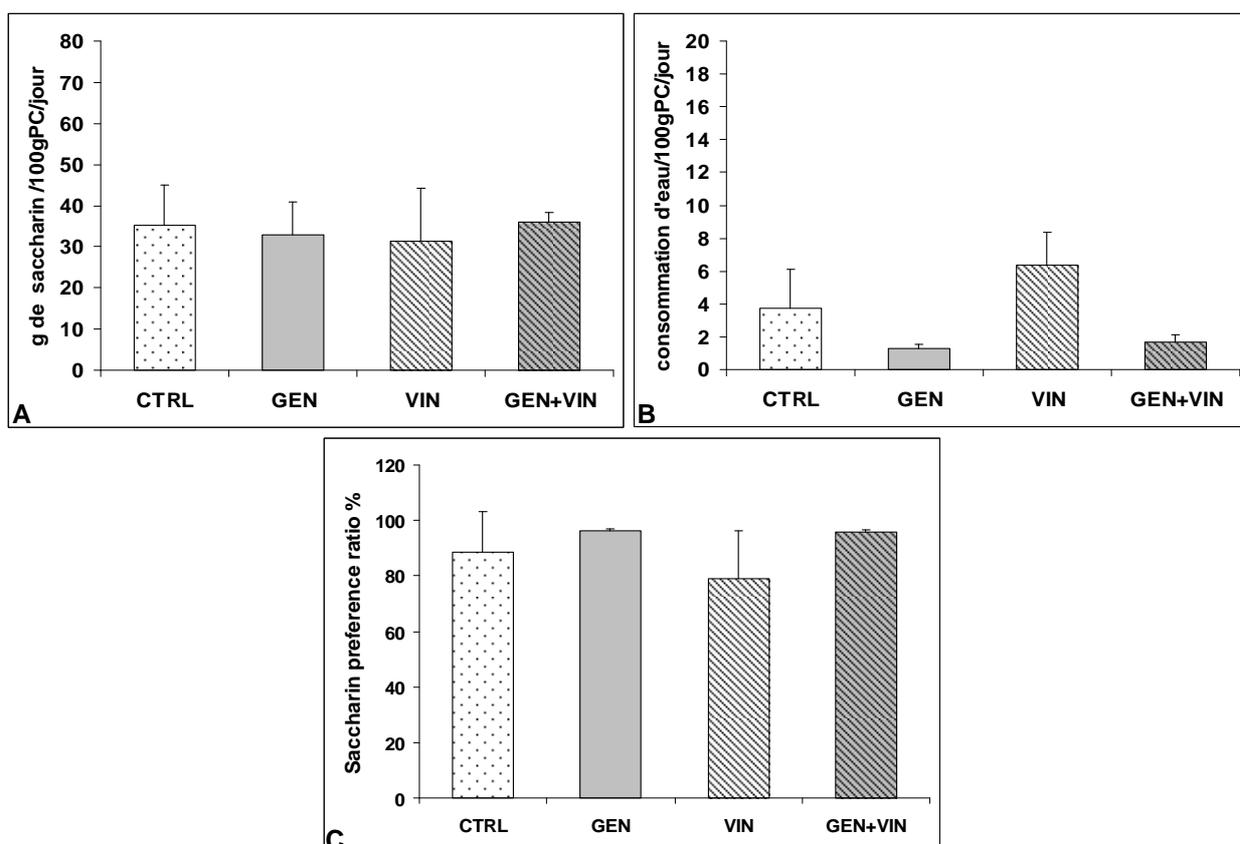


Figure 45 : Consommation de la solution de saccharine à 0.3% (A) et d'eau (B) et évaluation du ratio de préférence (C) chez les femelles au stade J35 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).

Les valeurs représentent des moyennes ± écart type n=12

1.2.2.2. EGF sérique

L'exposition à la génistéine et/ou la vinclozoline pendant la période de gestation et lactation n'a pas non plus d'effet sur la concentration de l'EGF sérique au stade J35 des femelles. Il n'existe aucune différence significative entre les quatre groupes (Figure 46).

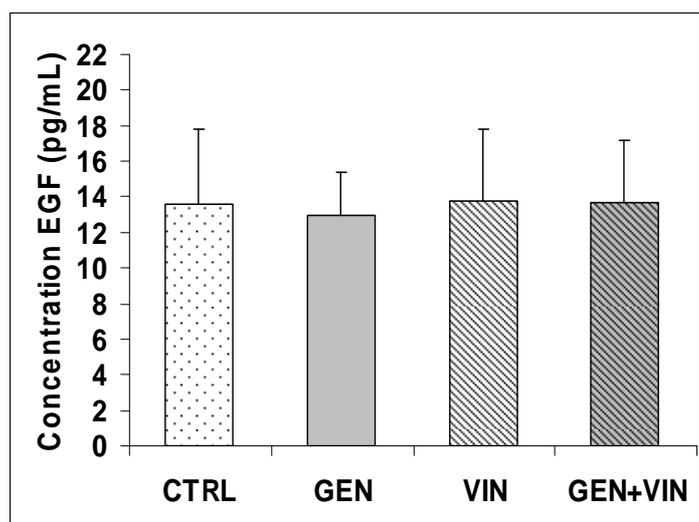


Figure 46: Concentration de l'EGF sérique circulant chez les femelles au stade J35 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).

Les valeurs représentent des moyennes \pm écart type n=10

En résumé, une exposition précoce en génistéine ou en vinclozoline a peu d'effet sur le développement général des femelles immatures. Cependant, comme chez le mâle, elle affecte le développement des glandes submandibulaires, et par voie de conséquence, l'expression des transcrits des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et ceux des facteurs de croissance. Toutefois, cela n'entraîne pas de modification des préférences gustatives ni des taux sériques d'EGF.

1.3. Effets chez les femelles en fin de puberté (J50)

Ce stade est un stade critique chez la femelle car il correspond au stade de maturation de la glande mammaire. Comme les glandes salivaires évoluent jusqu'à la puberté ou elles sont matures, ce stade a été sélectionné car il nous permet de bien mesurer le stade de maturité de la glande submandibulaire et de comparer avec celui de la glande mammaire.

1.3.1. Croissance et développement général

L'exposition quotidienne à 1mg/kg pc en génistéine et/ou vinclozoline pendant la gestation et la lactation n'affecte ni la prise alimentaire ni la consommation en eau des femelles du sevrage à J50. Le poids corporel et les poids des glandes SM des femelles J50 ne sont pas significativement différents entre les quatre groupes (Tableau VII).

Tableau VII : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle sur les paramètres de développement des femelles J50

	Contrôle	Génistéine	Vinclozoline	Génistéine + Vinclozoline
Poids corporel (g)	163.4 ± 3.8	176.9 ± 2	158.6 ± 4	171,6 ± 4.6
Poids des glandes SM (g/100g/PC)	0.167 ± 0.007	0.169 ± 0.003	0.182 ± 0.005	0.168 ± 0.003

Les valeurs représentent des moyennes ± écart type n=10

1.3.2. Morphométrie de la glande SM

La glande submandibulaire des femelles au stade J50 présentent certaines particularités : en effet, à ce stade bien précis du développement, on observe normalement un changement de conformation ou une différenciation des canaux striés en GCT, la structure caractéristique des glandes matures chez les rongeurs. Chez tous les animaux traités, la proportion de GCT néoformés semble plus importante que celle observée chez les animaux témoins pour lesquels la cyno-différenciation des canaux striés en GCT semble encore en cours (Figure 47A-D).

Ceci est confirmé par le comptage histologique et l'analyse statistique pour le nombre de GCT néoformés (ANOVA, $p < 0.05$) : le nombre de GCT différenciés est significativement plus important au niveau des groupes GEN (+48.6% ; $p < 0.05$), VIN (+48.1% ; $p < 0.05$), et le groupe mélange GEN+VIN (+58.6% ; $p < 0.05$) comparés au groupe contrôle. Par contre aucune différence significative n'apparaît quant aux aires de ces GCT néoformés bien que visuellement, ils semblent plus larges que ceux des témoins (Figure 47E-F).

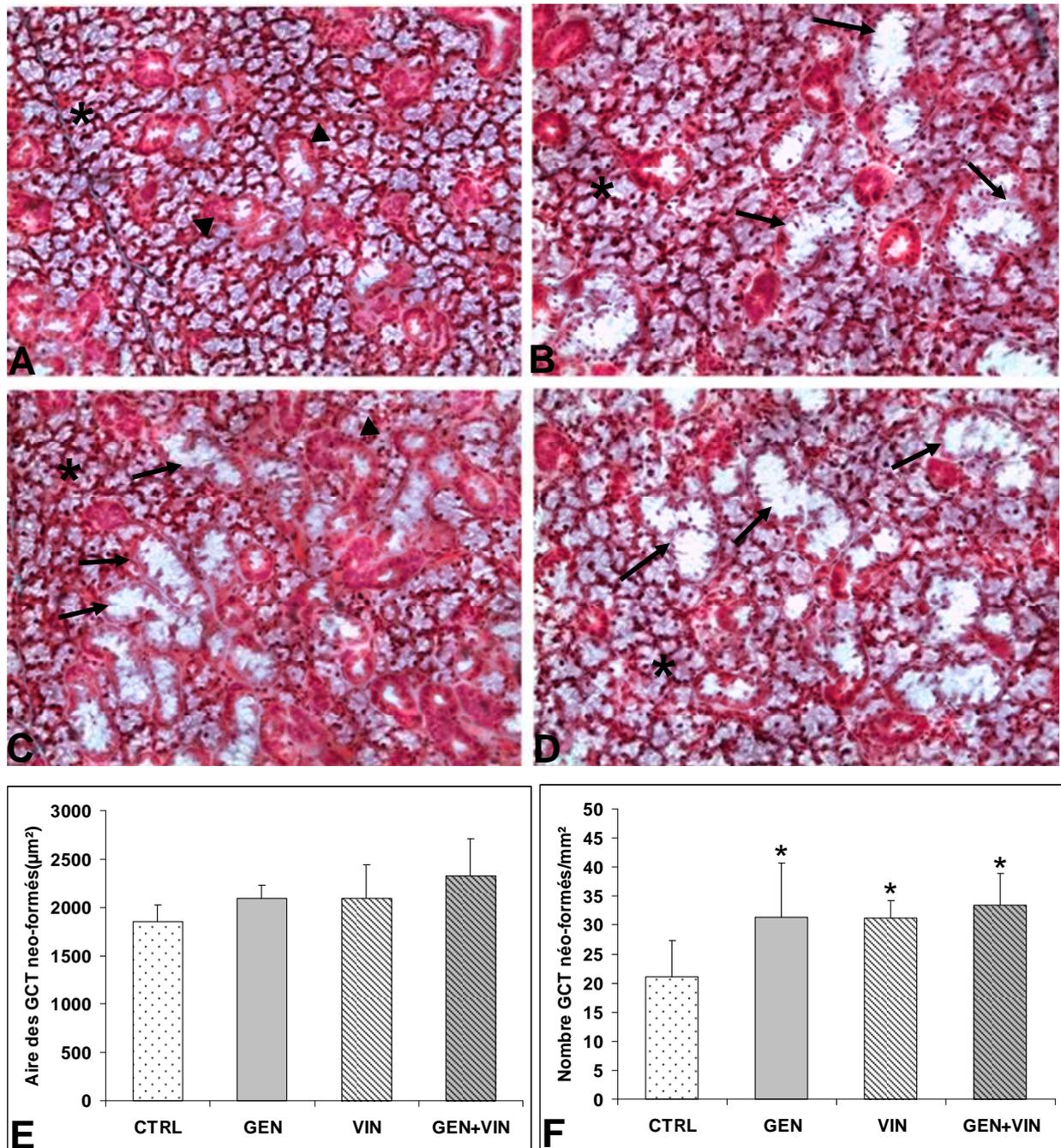


Figure 47 : Coupes histologiques et résultats morphométriques des glandes submandibulaires de femelles au stade J50 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).

Photomicrographies représentatives après coloration au Trichrome de Masson (X100) ; (A) CTRL, (B) GEN, (C) VIN et (D) GEN+VIN. Les acini séro-muqueux sont indiqués par des étoiles, les canaux striés en cours de différenciation par des têtes de flèches et les GCT néoformés par des flèches. L'aire des GCT néoformés est exprimée en µm² (E) et le nombre des GCT est exprimé par mm² (F). Les valeurs représentent des moyennes ± écart type. Significativité statistique par rapport au groupe contrôle : * p < 0.05 ; ANOVA suivi du Test de Tukey. (n=6).

1.3.3. Expression des ARNm codant pour les récepteurs hormonaux

Au stade J50, les ARNm des récepteurs des hormones sexuelles s'expriment aussi à des degrés différents dans la glande SM des animaux contrôles ; le AR est toujours le plus abondant (avec un nombre de cycle Ct = 27) en comparaison avec le ER α (Ct = 30) et avec le PR (Ct = 29), le ER β quant à lui n'est pas non plus détecté (Ct > 36). Seule l'expression du récepteur ER α est hautement affectée par tous les traitements (ANOVA, $p < 0.001$) avec une augmentation significative de son expression plus prononcée au niveau des groupes GEN (+140%, $p < 0.001$) et VIN (+136%, $p < 0.001$) par rapport au groupe CTRL, et une moindre augmentation au niveau du groupe mélange GEN+VIN (+96.3%, $p < 0.05$) (Figure 48A-48C).

1.3.4. Expression des ARNm codant pour les facteurs de croissance

A ce stade, les ARNm du facteur de croissance EGF sont également mieux exprimés au niveau des glandes SM des animaux contrôles (Ct = 23), comparativement aux ARNm des facteurs TGF α et du NGF (respectivement : Ct = 30 et Ct = 29). L'expression relative de l'EGF est significativement différente entre les quatre groupes (ANOVA, $p < 0.01$) tout comme celle du NGF (ANOVA, $p < 0.05$) et du TGF α (ANOVA, $p < 0.01$). Elle se trouve augmentée au niveau des groupes GEN (+68%, $p < 0.05$), VIN (+78%, $p < 0.05$) et au niveau du groupe mélange GEN+VIN (+77%, $p < 0.05$) par rapport au groupe CTRL. Le NGF est aussi plus exprimé dans tous les groupes traités GEN, VIN et GEN+VIN (respectivement : +56%; +56%, +48% ; $p < 0.05$). Les différents traitements augmentent aussi l'expression du TGF α avec une plus importante expression au niveau des groupes GEN (+57%, $p < 0.01$), VIN (+47%, $p < 0.05$) et GEN+VIN (+20%, $p < 0.05$) (Figure 48D-48F).

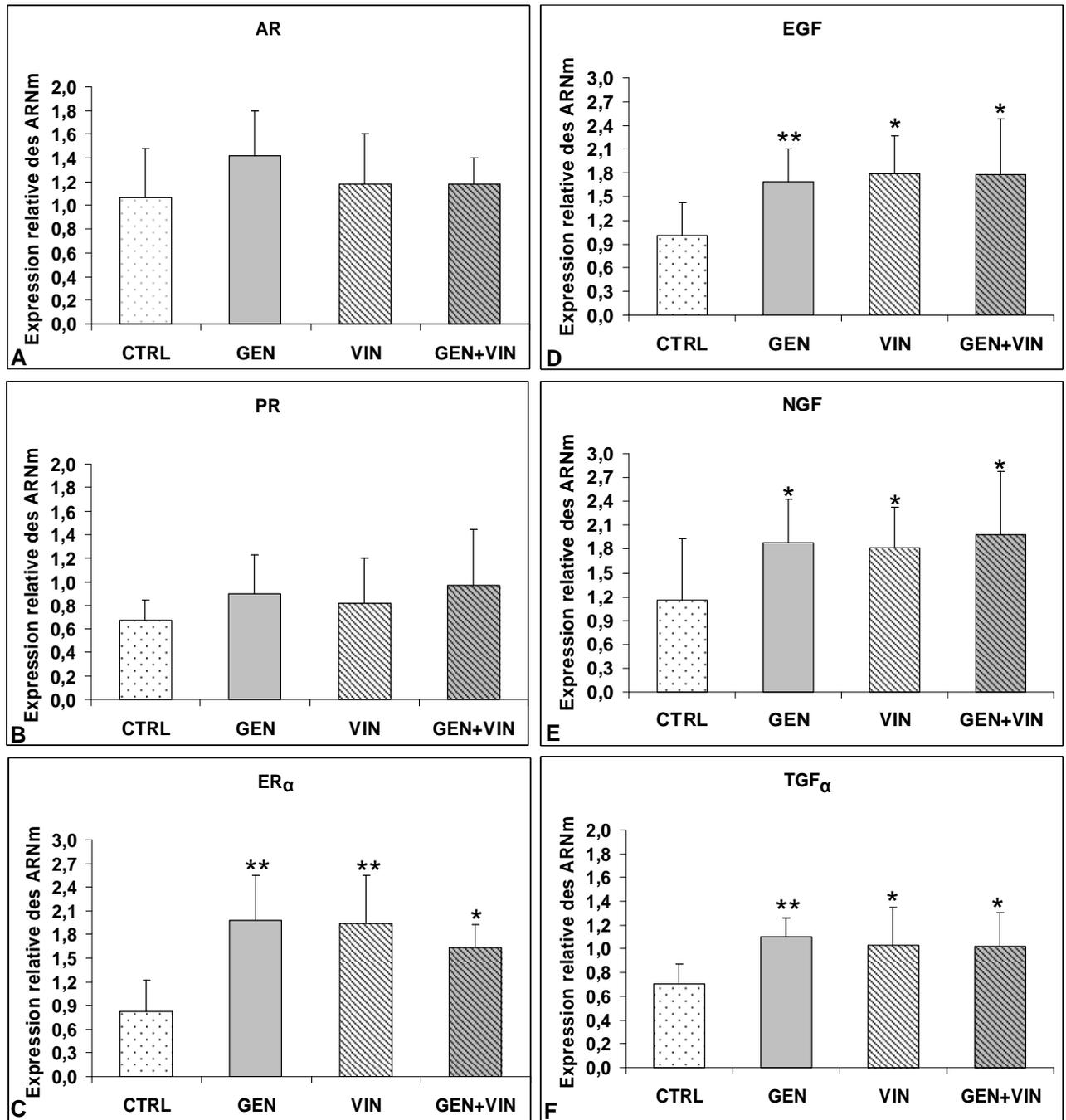


Figure 48 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN) sur l'expression des récepteurs hormonaux (A, B, C) et des facteurs de croissance (D, E, F) au niveau de la glande submandibulaire des rats femelles au stade J50.

Les valeurs représentent des moyennes \pm écart type. Significativité statistique par rapport au groupe contrôle : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ANOVA suivi du Test de Tukey. $n=10$.

1.3.5. Préférence au sucré

A J50, les femelles du groupe témoin boivent globalement autant qu'au stade immature (consommation saccharine + eau), et la préférence au sucré est équivalente (90%). Le test de préférence à la solution de saccharine effectué laisse entrevoir une tendance à moins boire de saccharine chez les animaux traités par les molécules seules, et ceux-ci semblent compenser par une plus grande consommation d'eau. Cependant, l'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative entre les différents groupes que ce soit pour la quantité de saccharine consommée ou pour la consommation d'eau. En conséquence nous en concluons qu'aucun effet significatif n'a été observé au niveau de la préférence à la saccharine (Figure 49).

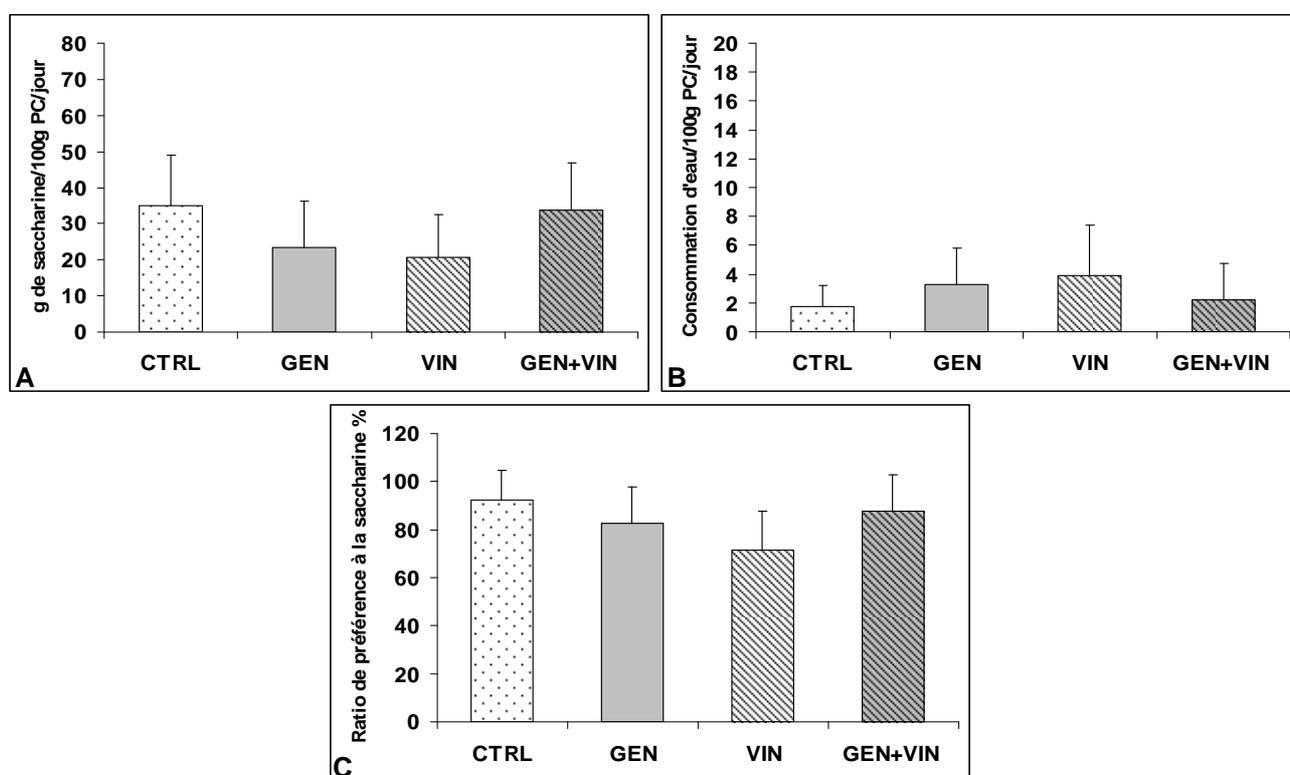


Figure 49: Consommation de la solution de saccharine à 0.3% (A) et d'eau (B) et évaluation du ratio de préférence (C) chez les femelles au stade J50 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type ; n=12).

1.3.6. EGF sérique

Au stade J50, les taux sériques du facteur EGF sont environ trois fois plus élevés qu'au stade immature puisqu'ils passent d'une valeur moyenne de 13,7 pg/mL à J35 à une valeur moyenne de 45 pg/mL à J50 : L'exposition à la génistéine et/ou la vinclozoline pendant la

période de gestation et lactation n'a pas non plus d'effet sur la concentration de l'EGF sérique au stade J50. Il n'existe aucune différence significative entre les quatre groupes (Figure 50).

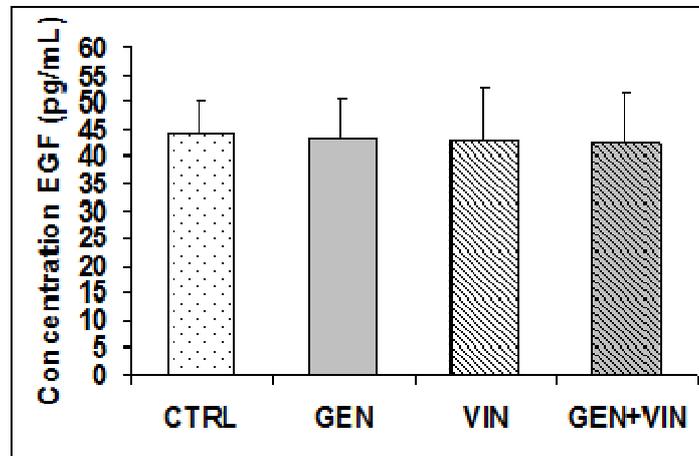


Figure 50: Concentration de l'EGF sérique circulant chez les femelles au stade J50 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).

Les valeurs représentent des moyennes \pm écart type n=10

En résumé, cette étude chez la femelle à J50 identifie des effets sur les structures sécrétrices qui sont associés à des effets sur l'expression moléculaire des récepteurs hormonaux et surtout à celle des facteurs de croissance. On assiste à un avancement de la maturité de la glande SM chez les femelles exposés aux molécules, qui se répercute sur la glande salivaire des animaux immatures par une augmentation de la taille des canaux striés et leurs disparition progressive qui se continue à l'âge de la puberté et se caractérisant par l'apparition avancée des GCT. Cet effet sur l'avancement de maturité est compatible avec celui observé sur l'avancement de la puberté annoncé par la date d'ouverture vaginale puberté identifiés par l'avancement de la date d'ouverture vaginale dans les lots traités. Le développement de ces structures est corrélé à une plus forte expression des facteurs de croissance qui traduit une plus forte activité endocrine. Tout comme au stade J35, cette étude à J50 n'identifie pas d'effets sur les préférences gustatives ni sur les taux d'EGF circulants et ceci malgré la forte induction de l'expression des mRNA codant pour ce facteur de croissance dans les glandes SM.

1.4. Discussion

Par cette étude d'exposition précoce à des PE, nous avons montré pour la première fois que le développement et l'expression génique de la glande salivaire submandibulaire pouvaient être affectés par la génistéine et la vinclozoline, seules ou en mélange. **Nos travaux identifient donc la glande salivaire comme une cible de perturbateurs endocriniens, plus particulièrement sensible à des composés œstrogéniques et anti-androgéniques**, chez les mâles et chez les femelles. De plus, notre étude identifie des effets différents selon le sexe qui révèlent un dimorphisme sexuel dans la réponse hormonale aux molécules utilisées.

Chez les mâles immatures, les résultats suggèrent un lien entre une altération des sécrétions exocrines et une modification des préférences gustatives (Kouidhi et al., accepté). Si l'action d'une exposition précoce en vinclozoline sur la préférence au sucré a été déjà décrite chez le rat (Flynn et al., 2001), nos travaux révèlent des effets de la génistéine qui renforcent la préférence au sucré induite par la vinclozoline, mais aussi ses effets sur les structures et les fonctions sécrétrices de la glande submandibulaire. Cet effet plus marqué avec le mélange GEN+VIN est à rapprocher de ceux déjà observés sur l'appareil reproducteur mâle (Eustache et al., 2009).

Puisque les effets sur les préférences et sur l'expression des mRNA des gènes de la glande submandibulaire impliqués dans les processus gustatifs ne persistent pas jusqu'à l'âge adulte, nous pouvons établir ici pour la première fois un lien possible entre une action des perturbateurs endocriniens sur les préférences gustatives et une action sur les sécrétions exocrines des glandes salivaires. L'induction des préférences au sucré s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la gustine (CA VI) et de la mucine 10, et d'une diminution de l'expression de la cystatine C. A noter que la gustine se révèle plus sensible aux effets œstrogéniques qu'aux effets anti-androgéniques, tandis que la cystatine C et la Mucine 10 présentent le même degré de sensibilité à tous les traitements.

L'analyse morphométrique identifie un effet ciblé sur les pro-acini seulement chez les mâles au stade J25, mais aucun effet n'apparaît au stade adulte. Chez les animaux traités, la persistance des pro-acini (précurseurs embryonnaires des acini) à l'âge immature peut traduire un retard de maturation qui est confirmé par un retard de la puberté (délai dans la date de séparation du prépuce). Ce retard de la maturation de la glande rappelle celui observé suite à une exposition au 5-bromodeoxyuridine des glandes SM de rats mâles immatures (Fukushima and Barka, 1976). Les pro-acini sont de type muqueux et produisent abondamment de la mucine (Moreira et al., 1991) et une plus forte expression de la Mucine 10 chez les rats traités peut être considérée comme une conséquence de ce retard de

développement. La diminution de l'expression de la gustine (CA VI) peut être reliée directement à une augmentation de la préférence au sucré parce qu'une faible concentration de la CA VI salivaire est associée à une diminution de la perception gustative (Henkin et al. 1999 a, b).

L'action des PE sur les structures sécrétrices se répercute aussi sur l'expression des transcrits codant pour les récepteurs hormonaux et les facteurs de croissance. Alors que l'expression des deux récepteurs AR et PR est induite de manière significative, notamment par la vinclozoline et par le mélange, l'expression des récepteurs aux œstrogènes n'est affectée par aucun traitement. Ceci confirme l'action prédominante de type androgénique sur la régulation génique des glandes salivaires chez le mâle.

A l'âge adulte, les structures sécrétrices des mâles traités par les perturbateurs endocriniens ont acquis un niveau de développement identique à celui des animaux témoins: les GCT sont bien développés et ne présentent pas d'anomalies histologiques. Parallèlement, l'expression des gènes gustatifs, tout comme la préférence au sucré, ne sont pas affectées par les traitements. Curieusement, alors que les traitements sont suspendus depuis le sevrage, l'expression des récepteurs AR et PR, ainsi que celle des facteurs de croissance EGF et TGF α , sont uniformément réprimées chez les adultes traités, indépendamment des propriétés hormonales initiales de la génistéine et de la vinclozoline. Nos résultats traduisent une programmation à terme : des modifications persistantes à long terme, des sécrétions endocrines des glandes salivaires consécutive à une exposition aux stades précoces de la vie. Cette observation est d'une importance capitale si l'on considère le rôle physiologique des facteurs de croissance EGF et TGF α produits par les glandes salivaires dans le maintien de l'homéostasie buccale (Mathison, 1995), mais également dans les processus de gamétogenèse (Arcieri and Martinelli, 1977 ; Liu et al 1994 ; Reyes et al 1995) et le rôle encore mal compris des glandes salivaires sur la croissance et le développement (Bodner et al., 1991 ; Li et al., 1983).

La sensibilité des glandes salivaires aux perturbateurs endocriniens revêt un caractère sexuel puisque les effets observés sur les glandes salivaires sont moins prononcés chez les femelles que chez les mâles et qu'en parallèle, nous n'observons pas d'effet sur les préférences au sucré. De plus, contrairement à ce qui est observé chez les mâles, chez les femelles, les effets de la vinclozoline se distinguent de ceux de la génistéine, qui ne sont pas systématiquement majorés lorsque les deux molécules sont administrées en mélange. Ainsi, les effets propres à la vinclozoline observés sur la distance ano-génitale et sur l'ouverture vaginale suggèrent que la GEN et la VIN n'ont pas d'effets similaires à la dose 1mg/kg/j. Cependant l'exposition à la vinclozoline conduit à une masculinisation des femelles comme le montre la distance ano-génitale au stade J21 du développement, traduisant un effet androgénique prédominant au cours de la période utérine, qui a été déjà

rapporté au niveau de l'appareil reproducteur des femelles avec cette molécule (Buckley et al., 2006). A l'inverse, les effets de la vinclozoline sur l'ouverture vaginale traduisent un effet œstrogénique post-natal qui entraîne un avancement de la puberté et peut se répercuter sur le développement de la glande salivaire. Cette empreinte œstrogénique pourrait provenir de la présence des métabolites M1 et M2 de la vinclozoline qui passent dans le lait maternel (Cravédi, communication personnelle) et qui possèdent aussi des effets anti-androgéniques et œstrogéniques.

Comme la glande mammaire, le développement de la glande salivaire est régulé par les estrogènes et les androgènes à la puberté (Gresik, 1980). Il est donc intéressant de noter que la génistéine et la vinclozoline agissent de la même manière au niveau de la glande SM en diminuant le nombre des canaux striés et en augmentant leurs aires, et l'effet du mélange a un effet cumulatif à J35. La diminution du nombre des canaux striés est couplée à une diminution de la prolifération cellulaire des acini (Ki-67) qui est plus prononcée au niveau du groupe GEN+VIN, ce qui fait penser à des troubles de la maturation de la glande salivaire prépubertaire. Selon Gresik (1980), au niveau de la glande SM de rats, les canaux striés se développent considérablement et deviennent hautement contournés à partir du 45^{ème} jour postnatal et commencent à accumuler une sécrétion apicale en granules ; avec nos traitements, nous assistons donc au même phénomène au regard des données histologiques relevées au stade J35, ce qui nous amène à conclure à un avancement du développement de la glande d'environ 10 jours chez la femelle.

Les structures de la glande SM des femelles observées à J50 confirment cette hypothèse puisqu'on assiste à l'apparition précoce de GCTs dans les groupes traités avec la génistéine, la vinclozoline et le mélange des deux. Cet effet rappelle l'effet observé avec les androgènes qui stimulent les GCT en formation chez les rats prépubères mâles et femelles (Sawada and Nomoura 1991). Comme l'indique une étude utilisant des composés estrogéniques de synthèse, cet effet peut être aussi provoqué par des composés de type estrogénique (Islander et al 2005), suggérant que la formation des GCT puisse être à la fois régulée par les androgènes et par les oestrogènes. De plus, la maturation des GCT est également fortement corrélée à l'expression des facteurs de croissance. L'EGF et le TGF α sont tous deux des ligands du récepteur EGF (EGFR) qui est lui-même impliqué dans le processus d'embryogénèse et de morphogénèse. Cependant le TGF α est sécrété de façon très importante à la naissance et sa concentration diminue avec l'âge (Moji et al. 1995), alors que l'EGF et le NGF augmentent de façon exponentielle jusqu'au 50^{ème} jour après la naissance, c'est-à-dire à la puberté, quand les estrogènes et les androgènes se mettent en place et les GCTs commencent leur maturité.

Notre étude montre qu'au stade J35, chez la femelle, la VIN, seule ou en mélange avec la GEN, a un effet répresseur sur les trois facteurs de croissance tandis que la GEN

seule est sans effet et que le mélange a un effet toujours plus prononcé. La diminution de l'expression de l'EGF à ce stade immature pourrait être corrélée à l'effet répresseur des estrogènes sur l'expression de l'EGF par analogie à ce qui est décrit au niveau de glandes SM de souris ovariectomisées (Tuomela et al., 1990) c'est-à-dire sur des souris ayant un très faible taux d'estrogènes. Cette diminution de l'expression de tous les facteurs de croissance dans les SM des femelles J35 peut aussi être due à un manque de production en estrogènes puisque les animaux sont prépubères, et par conséquent à une faible expression du récepteur ER. Dans ce sens, chez les animaux traités, pour lesquels la puberté est avancée, et où il existe aussi une accélération du développement de la glande mammaire (études menées en parallèle sur les animaux de cette même expérimentation) (El Sheikh Saad et al., 2012), on assiste à une augmentation de l'expression de tous les facteurs de croissance (EGF, TGF α , NGF) similaire avec tous les traitements, et qui est corrélée à une augmentation simultanée de l'expression du récepteur ER α au niveau des SM de femelles au stade J50 de tous les groupes traités. Cependant l'expression des récepteurs hormonaux et des facteurs de croissance semble ne pas modifier les caractéristiques histologiques des SM.

Les schémas de la figure 51 résument les résultats obtenus lors de l'exposition gestationnelle et lactationnelle

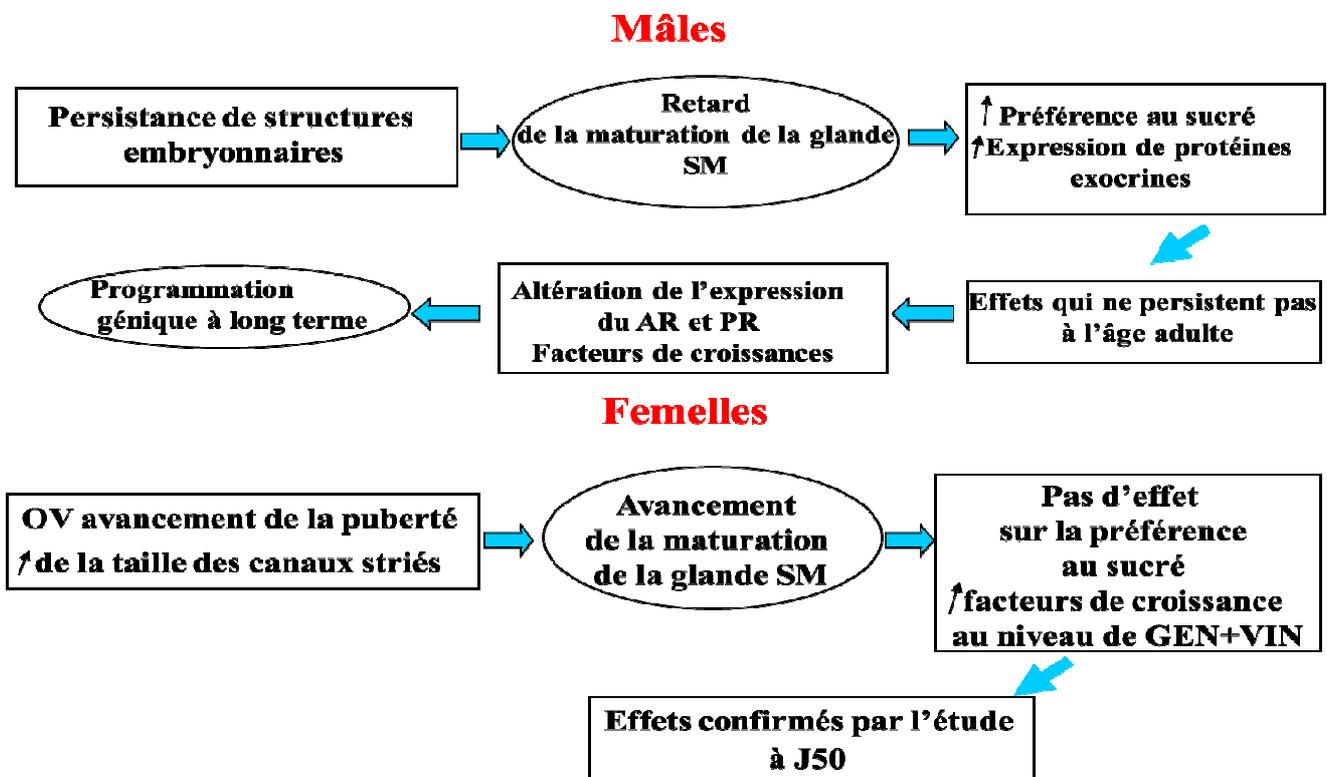


Figure 51: Récapitulatif de l'exposition gestationnelle et lactationnelle

En conclusion, les résultats de cette première étude démontrent que l'exposition pendant la période de gestation et lactation aux PE perturbe la morphogénèse de la glande submandibulaire, pouvant avoir des répercussions sur les fonctions salivaires exocrines et endocrines. A ce niveau, on est en droit de suggérer qu'une exposition utérine puisse programmer le fonctionnement des glandes salivaires jusqu'à en modifier les fonctions endocrines à l'âge adulte. Ces études de développement menées simultanément chez des mâles et des femelles issus d'une seule et même expérimentation animale soulignent des effets différents d'un sexe à l'autre, mais aussi d'un stade à un autre, probablement en lien avec les taux d'hormones circulantes. En effet, les SM des animaux immatures ou ayant une faible quantité d'hormones circulantes semblent plus sensibles au mélange des deux molécules alors que les SM des animaux adultes présentent des effets similaires avec tous les traitements.

Compte tenu du rôle des glandes salivaires dans divers processus biologiques, leur dysfonctionnement à l'âge adulte est également susceptible d'entraîner des désordres physiologiques. Ces données nous ont donc conduits à développer une nouvelle expérimentation animale en exposant les animaux du sevrage à l'âge adulte pour connaître les effets des perturbateurs endocriniens lors d'une exposition alimentaire post natale.

2. Etude 2 : Effets d'une exposition du sevrage à l'âge adulte

L'organisme réagit différemment aux perturbateurs endocriniens, et dans certaines conditions, une exposition alimentaire allant du sevrage à l'âge adulte peut entraîner des dérives fonctionnelles qui peuvent altérer le phénotype, mais aussi bien être compensée par des mécanismes de régulation du système hormonal. Aucun dommage fonctionnel n'est alors perceptible malgré une perturbation réelle au niveau moléculaire. Les organismes en développement sont beaucoup plus vulnérables, et cette vulnérabilité ne concerne pas seulement les fœtus exposés *in utero*, mais peut aussi concerner les individus exposés pendant la période de l'enfance et la période de la puberté. Lors du développement prépubertaire d'un organisme, si les mécanismes de régulation ne peuvent pas compenser correctement l'exposition, des altérations et autres dommages durables peuvent survenir au cours de ces étapes tardives du développement et se répercuter sur l'homéostasie générale, entraînant des déséquilibres susceptibles d'engendrer des maladies métaboliques ou fonctionnelles.

Selon la même stratégie que celle développée dans la première partie, nous avons donc exploré les effets de la génistéine et/ou vinclozoline sur les rats mâles et femelles pendant la période de croissance et de la puberté c'est-à-dire depuis le sevrage jusqu'à l'âge jeune adulte afin de voir quel sont les effets de nos molécules lors d'une longue période d'exposition alimentaire incluant la période pubertaire et de comparer ces effets aux effets observés pendant la gestation/lactation, c'est-à-dire lors d'une exposition précoce via la mère. Les animaux sont exposés tous les deux jours aux mêmes doses que précédemment, et les effets sont observés au stade jeune adulte chez le mâle et chez la femelle (J100).

1.1. Chez les rats mâles (J100)

1.1.1. Croissance et développement général

L'exposition quotidienne directe à 1mg/kg pc en génistéine et/ou vinclozoline à partir du sevrage n'affecte ni la prise alimentaire ni la consommation en eau des mâles à J100 ; Le poids corporel et les poids des glandes SM des mâles J100 ne sont pas significativement différents entre les quatre groupes. (Tableau VIII).

Tableau VIII : Effet de l'exposition directe à la génistéine et /ou à la vinclozoline sur le poids corporel relatif et le poids des glandes SM des mâles J100

	Contrôle	Génistéine	Vinclozoline	Génistéine + Vinclozoline
Poids corporel (g)	408.8 ± 11,9	415.5 ± 14.2	418.3 ± 13.6	392 ± 13
Poids des glandes SM (g/100g/PC)	0.143 ± 0.019	0.144 ± 0.018	0.144 ± 0.015	0.148 ± 0.019

Les valeurs représentent des moyennes ± écart type n=10

1.1.2. Morphométrie de la glande SM

Au stade J100, on retrouve chez les mâles témoins une prédominance de GCT bien différenciés et bien nets (Figure 52A). Les groupes GEN (Figure 52B) et VIN (Figure 52C) semblent présenter des GCT plus volumineux que ceux du groupe CTRL et du groupe GEN+VIN (Figure 52D). Ceci est confirmé par la quantification de l'aire totale des GCT (ANOVA; $p < 0.01$) : on assiste à une augmentation significative de l'aire des GCT au niveau du groupe GEN (+38%, $p < 0.01$) et du groupe VIN (+42%, $p < 0.01$) par rapport au groupe CTRL et on remarque seulement une tendance à l'augmentation dans le groupe GEN+VIN (+25%, $p < 0.1$) (Figure 52F).

Par contre aucune différence significative entre les quatre groupes n'a été observé quant au nombre des GCT (Figure 52E).

1.1.3. Expression des ARNm codant pour les récepteurs hormonaux

Au stade J100, les ARNm codant pour les récepteurs stéroïdiens sont exprimés différemment au niveau de la glande SM des mâles contrôles ; le AR est le plus abondant (nombre de cycle Ct = 27) en comparaison avec le PR (Ct = 32), le ER α quant à lui n'est pas détecté (Ct > 36). L'expression du récepteur AR est affecté par tous les traitements (ANOVA, $p < 0.01$) avec une diminution de son expression plus prononcée au niveau des groupes GEN (-42%, $p < 0.01$) et VIN (-56%, $p < 0.01$) par rapport au groupe CTRL, et une moindre diminution au niveau du groupe mélange GEN+VIN (-34%, $p < 0.05$) (Figure 53A). L'expression du PR est aussi affectée par tous les traitements (ANOVA ; $p < 0.01$) cependant avec une augmentation très prononcée au niveau des groupes GEN (+107%, $p < 0.01$) et VIN (+100%, $p < 0.05$) par rapport au groupe CTRL et seulement une tendance au niveau du groupe mélange GEN+VIN (+19%, $p < 0.1$) (Figure 53B).

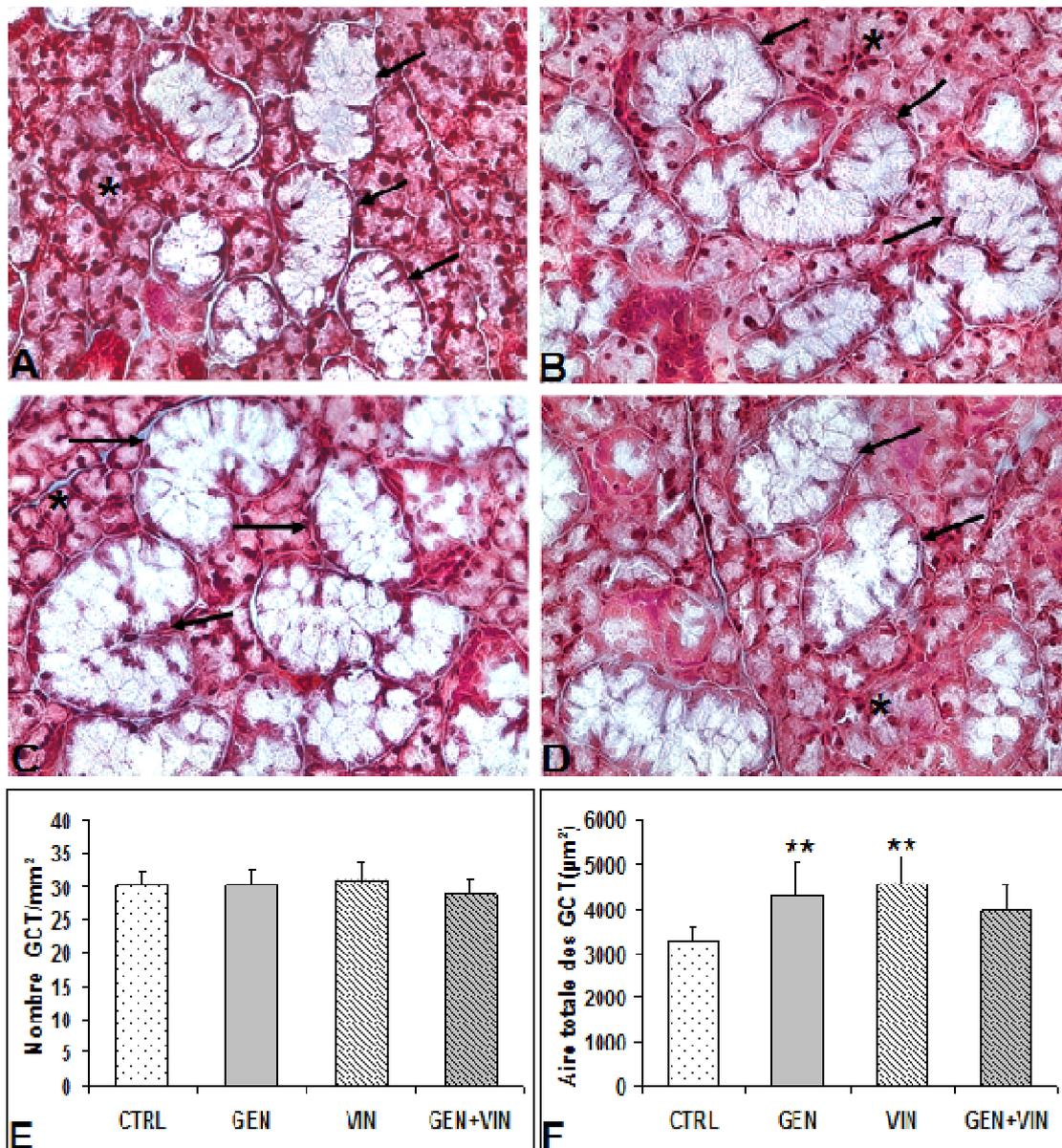


Figure 52 : Coupes histologiques et résultats morphométriques des glandes submandibulaires de rats mâles au stade adulte J100 suite à l'exposition directe du sevrage à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN). Photomicrographies représentatives coloration Trichrome de Masson (X200). Les acini séromuqueux sont indiqués par des étoiles, les GCT par des flèche ; (A) SM du groupe CTRL, (B) SM du groupe GEN, (C) SM du groupe VIN et (D) SM du groupe GEN+VIN. Le nombre des GCT est exprimé par mm² (E) et l'aire totale des GCT exprimée en µm²(F).

Les valeurs représentent des moyennes ± écart type. n=6 Significativité statistique par rapport au groupe contrôle : ** p < 0.01 ; ANOVA suivi du Test de Tukey.

1.1.4. Expression des ARNm codant pour les facteurs de croissance

A J100, les ARNm codant pour le facteur de croissance EGF sont très exprimés au niveau des glandes SM des animaux contrôles (Ct = 22), par contre les ARNm codant pour le TGF α sont moins exprimés (Ct = 30). Pour des problèmes techniques, nous n'avons pas pu doser les ARNm du gène NGF à ce stade. L'expression relative de l'EGF est significativement différente entre les quatre groupes (ANOVA, $p < 0.01$), et se trouve augmentée au niveau des groupes GEN (+88%, $p < 0.01$) et VIN (+94%, $p < 0.01$) par rapport au groupe CTRL ; cependant au niveau du groupe mélange GEN+VIN, on note là encore, seulement une tendance (+58%, $p < 0.1$) (Figure 53C). Par contre les différents traitements n'ont pas d'effets significatifs sur l'expression du TGF α . (Figure 53D).

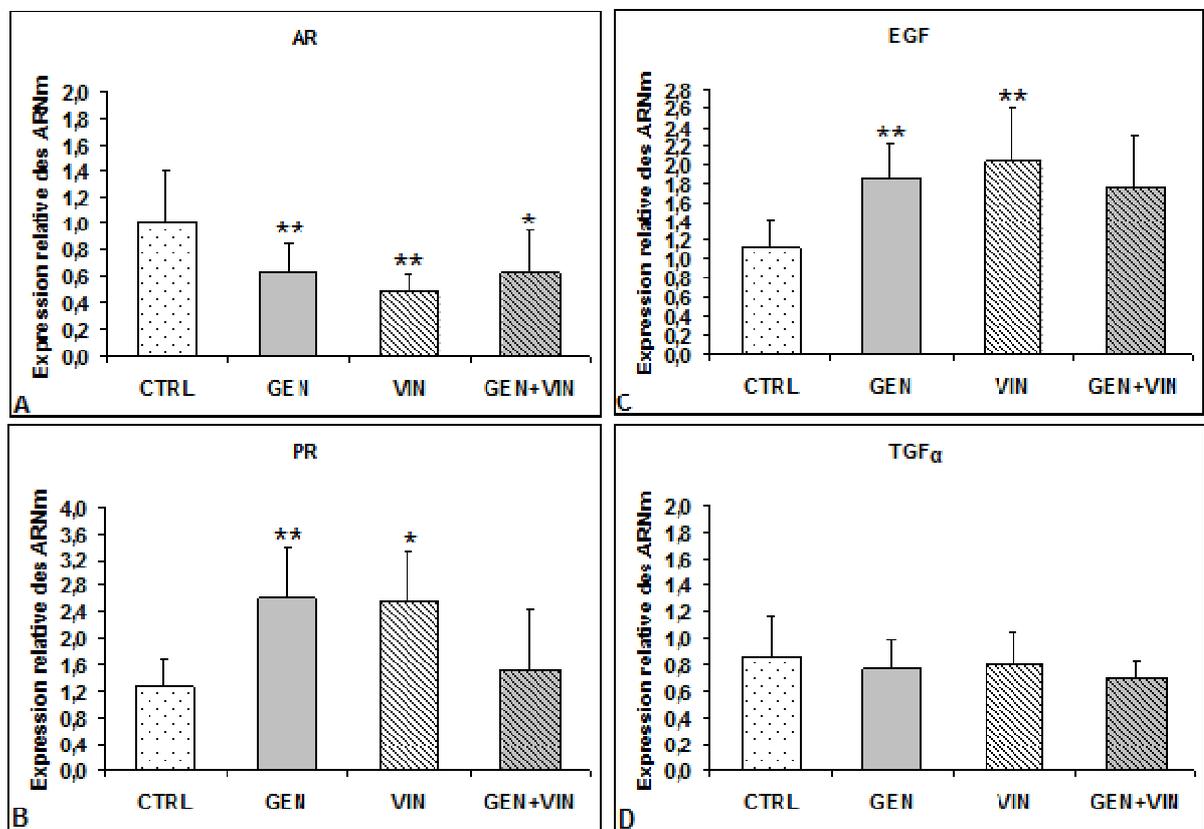


Figure 53 : Effet de l'exposition directe du sevrage à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN) sur l'expression des récepteurs hormonaux (A, B) et des facteurs de croissance (C,D) au niveau de la glande submandibulaire des rats mâles au stade J100.

Les valeurs représentent des moyennes \pm écart type. Significativité statistique par rapport au groupe contrôle : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ANOVA suivi du Test de Tukey. $n=10$

1.1.5. Préférence au sucré

Le test de préférence à la solution de saccharine effectué au stade J100 n'a révélé aucune différence significative entre les différents groupes, que ce soit pour la quantité de saccharine consommée ou pour la consommation d'eau. Par conséquent aucun effet significatif n'a été observé au niveau de la préférence à la saccharine quoiqu'on note une légère diminution pour le groupe GEN par rapport au groupe CTRL ($p < 0.1$) (Figure 54).

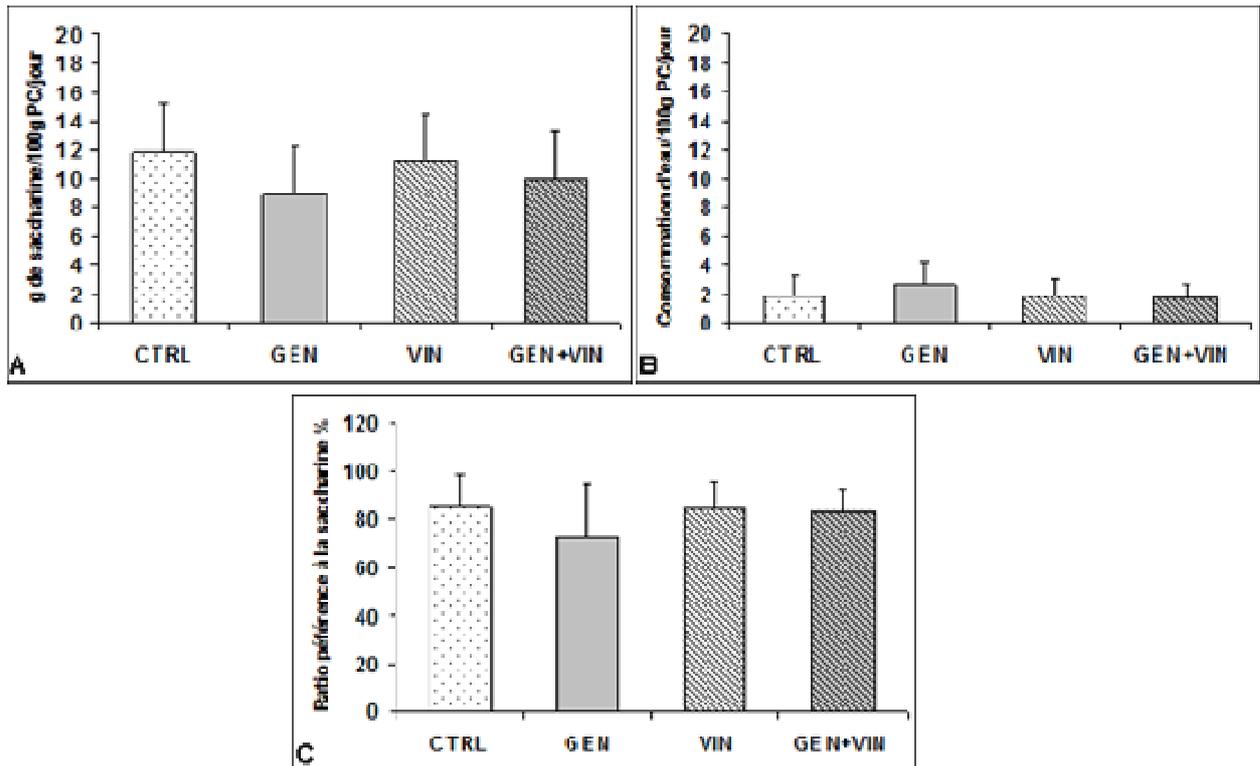


Figure 54 : Consommation de la solution de saccharine à 0.3% (A) et d'eau (B) et évaluation du ratio de préférence (C) chez les mâles au stade J100 directe du sevrage jusqu'à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN). Les valeurs représentent des moyennes ± écart type n=12.

1.1.6. Dosage de l'EGF

La concentration de l'EGF sérique présente des différences significatives entre les quatre groupes (ANOVA ; $p < 0.01$) ; avec une augmentation significative au niveau des groupes GEN (+24%, $p < 0.05$) et VIN (+27%, $p < 0.01$) par rapport au groupe CTRL. Par contre on n'observe pas d'effet sur la concentration de l'EGF au niveau du groupe mélange GEN+VIN (Figure 55).

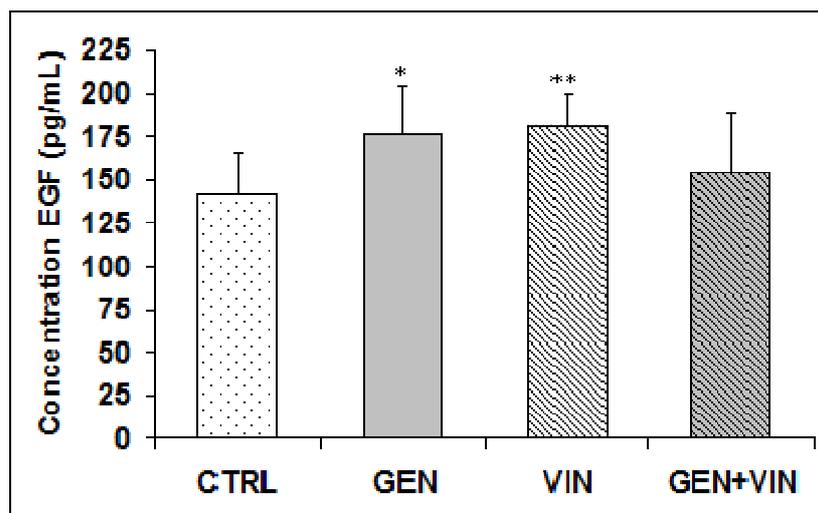


Figure 55: Concentration de l'EGF sérique circulant chez les mâles au stade J100 suite à l'exposition directe du sevrage jusqu'à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).

Les valeurs représentent des moyennes \pm écart type. Significativité statistique par rapport au groupe contrôle : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ANOVA suivi du Test de Tukey. $n=10$.

En résumé, nos résultats révèlent qu'une exposition plus tardive à la génistéine et la vinclozoline à une faible dose peuvent agir comme des agonistes du récepteur des androgènes au niveau des glandes SM de rats mâles quand ils sont administrés directement depuis le jeune âge ; les effets engendrés ressemblent à des effets « androgen-like » puisqu'ils augmentent l'expression du AR et l'expression de l'EGF dans la glande en elle-même et au niveau du sérum. Toutefois, l'effet disparaît lorsque les deux composés sont administrés en mélange.

1.2. Effets chez les rats femelles (J100)

1.2.1. Croissance et développement général

L'exposition quotidienne directe des femelles avec 1mg/kg pc en génistéine et/ou vinclozoline à partir du sevrage n'affecte ni la prise alimentaire ni la consommation en eau des femelles à l'âge adulte (J100) ; Le poids corporel et les poids des glandes SM des femelles J100 ne sont pas significativement différents entre les quatre groupes (Tableau IX).

Tableau IX : Effet de l'exposition directe à la génistéine et /ou à la vinclozoline sur le poids corporel relatif et le poids des glandes SM des femelles J100

	Contrôle	Génistéine	Vinclozoline	Génistéine + Vinclozoline
Poids corporel (g)	250.8 ± 8.8	247.3 ± 6.1	248.8 ± 4.8	239.7 ± 5.7
Poids des glandes SM (g/100g/PC)	0.148 ± 0.028	0.160 ± 0.016	0.160 ± 0.014	0.162 ± 0.018

Les valeurs représentent des moyennes ± écart type n=10

1.2.2. Morphométrie de la glande SM

La glande SM des femelles adultes à J100 présente des acini séromuqueux et des tubules granulaires (GCT) bien différenciés mais toutefois moins volumineux que ceux des mâles. En apparence on ne note pas de différence au niveau de l'histologie de la glande SM entre les quatre groupes (Figure 56A-D). L'étude morphométrique confirme qu'aucun groupe ne diffère significativement de l'autre quant au nombre des GCT et aux aires des GCT (Figure 56E-F).

1.2.3. Expression des ARNm codant pour les récepteurs hormonaux

Au stade J100, les ARNm codant pour les récepteurs des hormones sexuelles chez la femelle ne sont pas non plus tous exprimés au niveau de la glande SM des animaux contrôles ; le AR reste le plus abondant (avec un nombre de cycle Ct = 27) en comparaison avec le ER α (Ct = 32). Par contre nous n'avons pas réussi à détecter le PR (Ct > 36). L'expression du récepteur AR n'est pas modifiée par les traitements : aucun groupe ne diffère significativement de l'autre. L'expression du ER α est différente entre les quatre groupes (ANOVA, p < 0.05), et elle est significativement plus faible dans le groupe GEN+VIN par rapport au groupe VIN (-39,1% ; p<0.01) mais il ne ressort cependant aucun effet significatif des traitements par rapport au groupe CTRL, et ces résultats sont à prendre avec précaution compte tenu du faible niveau d'expression (Figure 57A-B).

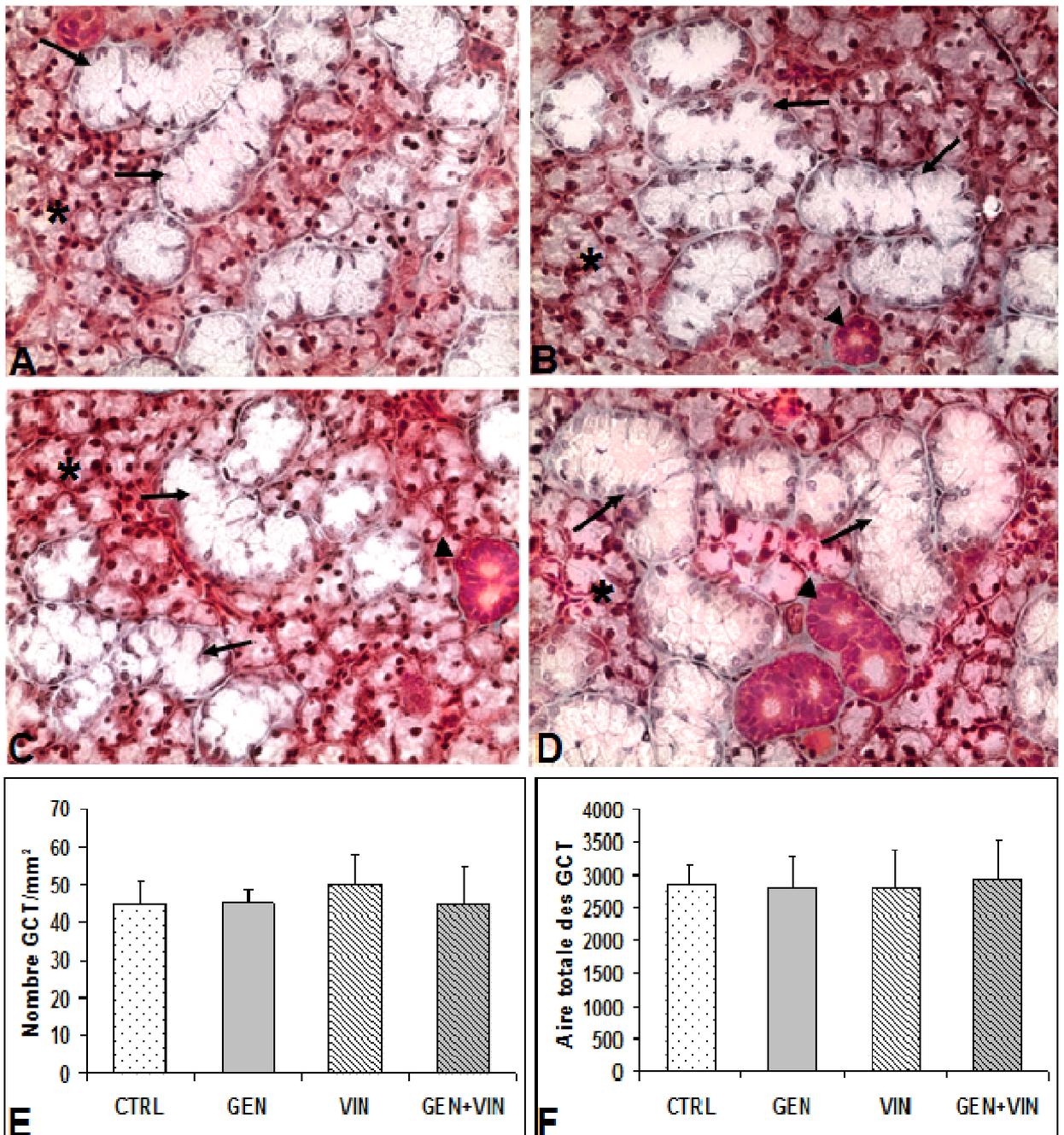


Figure 56 : Coupes histologiques et résultats morphométriques des glandes submandibulaires de femelles au stade J100 suite à l'exposition directe du sevrage à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN). Photomicrographies représentatives coloration Trichrome de Masson (X200) ; (A) SM du groupe CTRL, (B) SM du groupe GEN, (C) SM du groupe VIN et (D) SM du groupe GEN+VIN. Les acini séromuqueux sont indiqués par des étoiles, les canaux striés des têtes de flèches et les GCT par des flèches. Le nombre des GCT est exprimé par mm² (E) et l'aire totale des GCT exprimée en µm²(F). Les valeurs représentent des moyennes ± écart type n=6

1.2.4. Expression des ARNm codant pour les facteurs de croissance

A ce stade, l'EGF est bien exprimé au niveau des SM des animaux témoins (Ct = 22) par rapport au TGF α (Ct = 33). Par contre, contrairement à J35 et à J50, nous n'avons pas réussi à détecter le NGF à ce stade. L'expression relative de l'EGF présente des différences entre les quatre groupes (ANOVA, $p < 0.05$), diminuant au niveau du groupe GEN+VIN par rapport au groupe VIN (- 33.3 % ; $p < 0.01$). Mais aucun groupe des traités ne présente de différences avec le groupe CTRL. L'expression du TGF α n'est pas modifiée par les traitements aucun groupe ne diffère significativement de l'autre (Figure 57C-D).

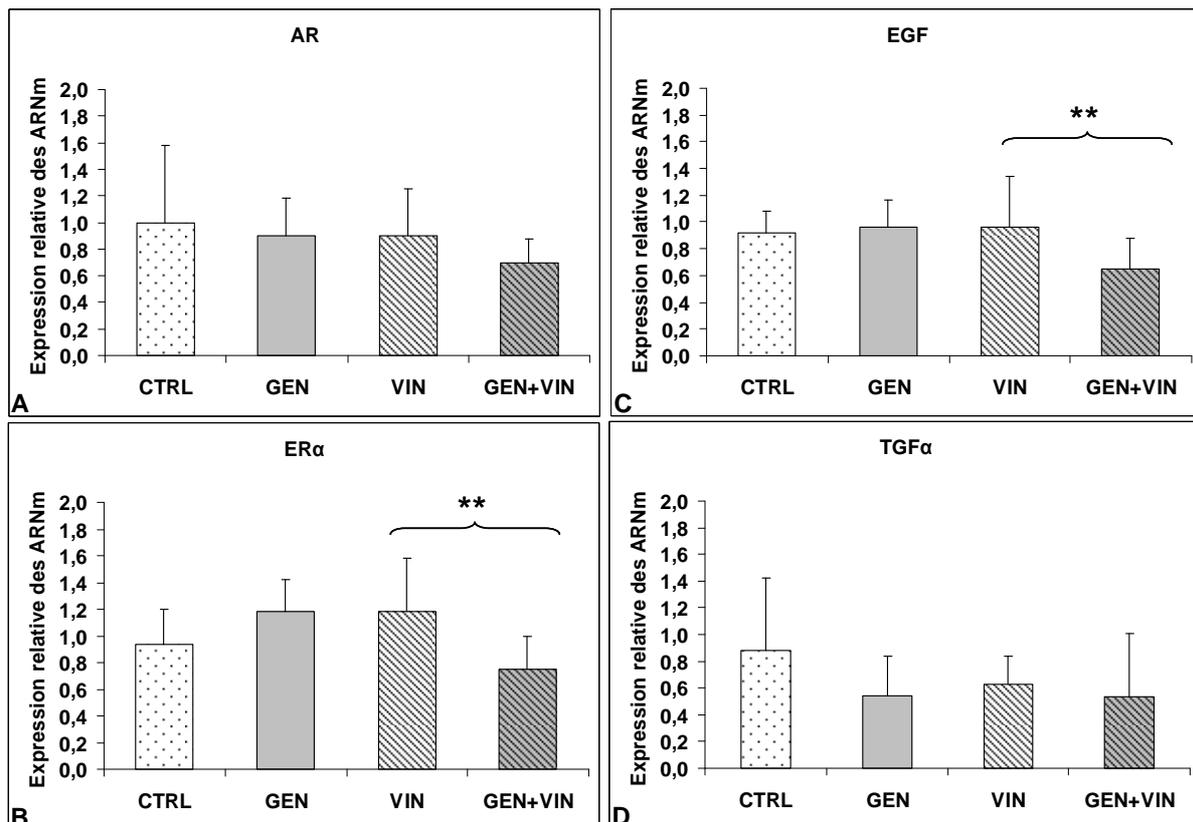


Figure 57 : Effet de l'exposition directe du sevrage à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN) sur l'expression des récepteurs hormonaux (A, B) et des facteurs de croissance (C,D) au niveau de la glande submandibulaire des rats femelles au stade J100.

Les valeurs représentent des moyennes \pm écart type.

Significativité statistique par rapport au groupe contrôle : ** $p < 0.01$; ANOVA suivi du Test de Tukey. $n=10$.

1.2.5. Préférence au sucré

Les femelles adultes à J100 consomment autant de saccharine et d'eau que ce qui avait été noté à J35 et J50, avec un seuil de préférence de 90%. Le test de préférence à la solution de saccharine effectué à ce stade n'a révélé aucune différence significative entre les différents groupes que ce soit pour la quantité de saccharine consommée ou pour la consommation d'eau et de fait, aucun effet n'a été observé au niveau de la préférence à la saccharine (Figure 58).

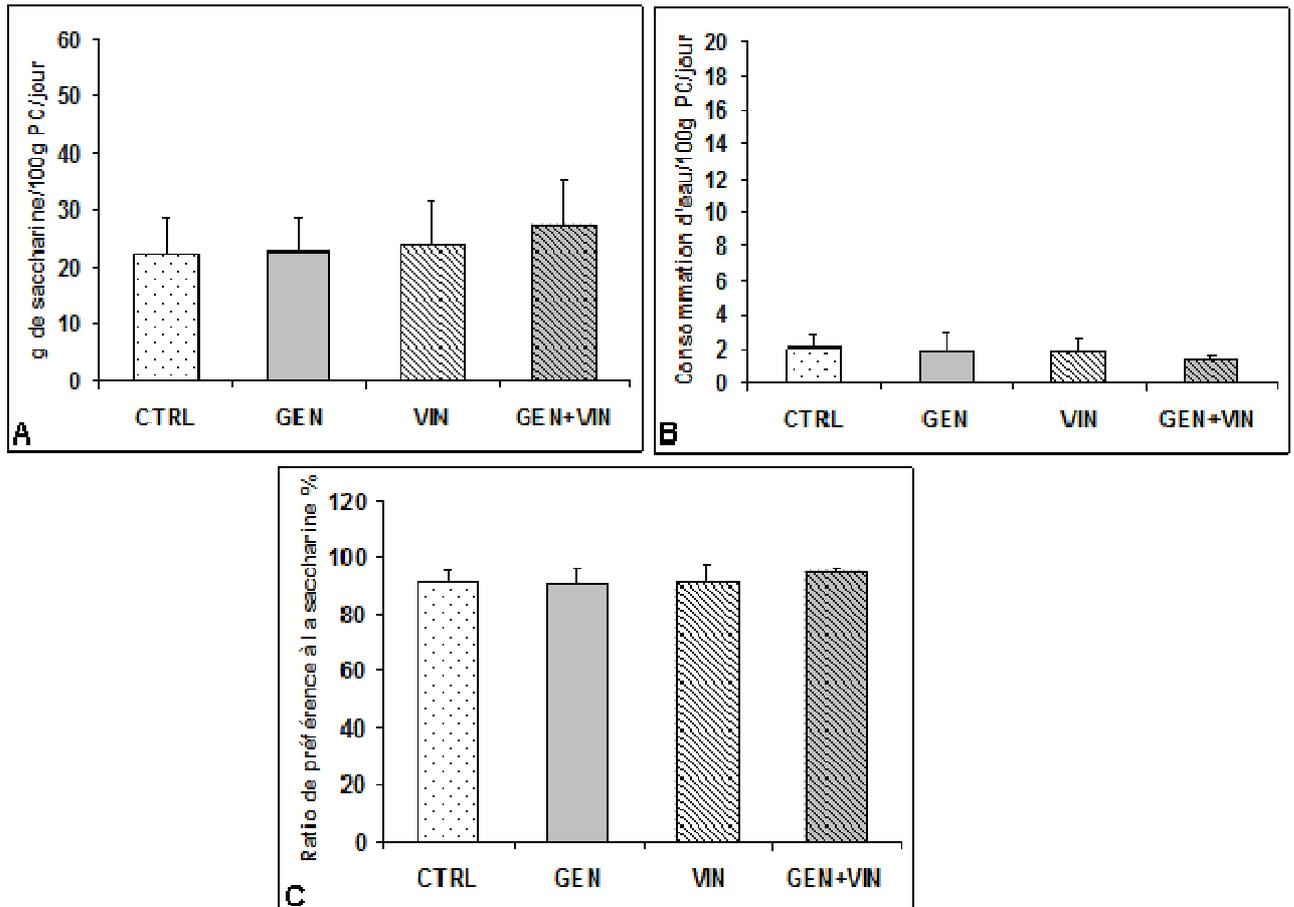


Figure 58 : Consommation de la solution de saccharine à 0.3% (A) et d'eau (B) et évaluation du ratio de préférence (C) chez les femelles au stade J100 directe du sevrage jusqu'à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN). Les valeurs représentent des moyennes ± écart type n=12.

1.2.6. EGF sérique

L'exposition directe à la génistéine et/ou la vinclozoline n'a aucun effet sur la concentration sérique de l'EGF chez les femelles adultes. Les concentrations ne sont pas statistiquement différentes entre les quatre groupes (Figure 59).

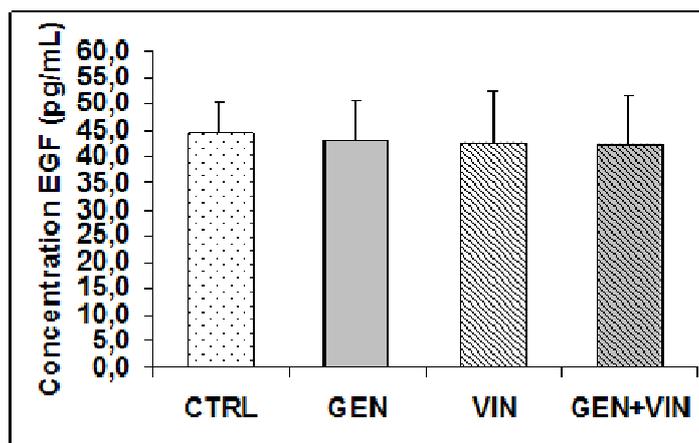


Figure 59 : Concentration de l'EGF sérique circulant chez les femelles au stade J100 suite à l'exposition directe du sevrage jusqu'à l'âge adulte à 1mg/Kg/pc de génistéine (GEN), vinclozoline (VIN), et le mélange (GEN+VIN).

En résumé, nos résultats révèlent qu'une exposition plus tardive à la génistéine et la vinclozoline à une faible dose n'ont pas d'effet significatif sur les glandes SM de rats femelles; les effets engendrés étant peu nombreux et souvent très faibles. Cette étude présente cependant l'intérêt de confirmer la relation entre une action sur la morphométrie des structures sécrétrices et une action sur les fonctions endocrines. De même, elle confirme que les sécrétions endocrines ne sont pas corrélées aux préférences gustatives.

1.3. Discussion

Dans cette nouvelle étude, nous avons montré, d'une part, que l'exposition directe à la génistéine et/ou vinclozoline n'a d'effet que sur un seul sexe, le mâle, et d'autre part, en considérant l'étude précédente sur l'exposition précoce, que les effets varient selon la période d'exposition. En effet, à l'âge adulte, tandis qu'aucun effet n'est observé chez les femelles, des effets observés sur les structures sécrétrices chez le mâle ; ces effets diffèrent de ceux observés lors de l'exposition néonatale, tant par l'action des molécules seules, mais aussi du mélange puisque l'effet de synergie du mélange GEN+VIN identifié précédemment n'est plus retrouvé. Au contraire, la co-exposition semble atténuer les effets obtenus avec des molécules seules.

Concernant l'action des composés sur les préférences gustatives, cette étude n'identifie pas d'effet significatif sur la préférence au sucré, en accord avec ce qui est décrit dans la littérature avec la génistéine (Slikker et al 2001).

Quant aux glandes salivaires, cette étude d'exposition du sevrage à l'âge adulte met particulièrement en avant l'impact de la génistéine seule et de la vinclozoline seule sur l'aire des GCTs. Cette augmentation des GCTs induite par la génistéine est à rapprocher de celle obtenue lors d'une alimentation supplémentée en soja chez le rat mâle, et pour lesquels un effet sur le testicule était également décrit (Vanderley et al., 1995). Dans le même sens, nos résultats rappellent l'effet d'un traitement à la testostérone sur ces structures (Chrétien et al., 1977 ; Rins de David et al., 1991). Tout concorde pour supposer un effet sous-jacent de nature androgénique puisque la réduction de l'aire totale des GCT provoquée par une castration, effet reversée par l'administration de testostérone (Amano et Iseki, 1998). Afin d'appuyer cette hypothèse, l'augmentation de l'aire des GCT que nous observons dans les lots traités est liée à une augmentation de l'expression du récepteur l'AR dans tous les groupes traités confirmant la réponse androgéniques de nos molécules. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la génistéine et la vinclozoline (via ses métabolites oestrogéniques), peuvent exercé des effets de type oestrogénique sur la synthèse du récepteur AR).

Cependant, si l'on se réfère à l'action de la génistéine, qui est un phytoestrogène à plus forte activité oestrogénique, le mécanisme n'est pas très clair. Puisqu'elle agirait dans certains cas comme un agoniste/antagoniste partiel dans certains tissus AR spécifiques tel que la prostate (Pihlajamaa et al., 2011). L'hypothèse quant au fait que la vinclozoline et la génistéine agirait comme des agonistes du AR pourrait expliquer le peu d'effet du mélange sur les glandes SM de mâles. L'effet androgénique des molécules est aussi confirmé par l'augmentation spécifique de l'expression de l'EGF dans la glande SM corrélée à celle des taux d'EGF au niveau sérique. En effet plusieurs études montrent que la testostérone induit l'expression de l'EGF dans la glande SM (Arancibia et al., 1985 ; Gubits et al., 1986 ; Hiramatsu et al., 1994) et elle induirait aussi sa concentration sérique (Kasayama et al., 1989).

Nos résultats révèle que l'exposition à la génistéine ou à la vinclozoline à une faible dose mais pas le mélange peuvent agir comme des agonistes du récepteur des androgènes au niveau des glandes SM de rats mâles quand ils sont administrés directement depuis le jeune âge et engendrer des effets « androgen-like » en augmentant l'expression du AR et l'expression de l'EGF dans la glande en elle-même et au niveau du sérum. Ces résultats sont d'une importance capitale puisqu'ils montrent des effets endocriniens direct de ces xénohormones à travers la concentration de l'EGF qui se trouve être un excellent mitogène impliqués dans plusieurs processus physiologiques notamment dans la reproduction masculine (Reyes et al., 1995) et l'augmentation de sa concentration dans la circulation peut

entraîner de nombreuses altérations comme des tumeurs des gonades. Ce dernier aspect doit être plus approfondi pour pouvoir tirer des conclusions.

La figure 60 résume les résultats obtenus lors de l'exposition adulte.

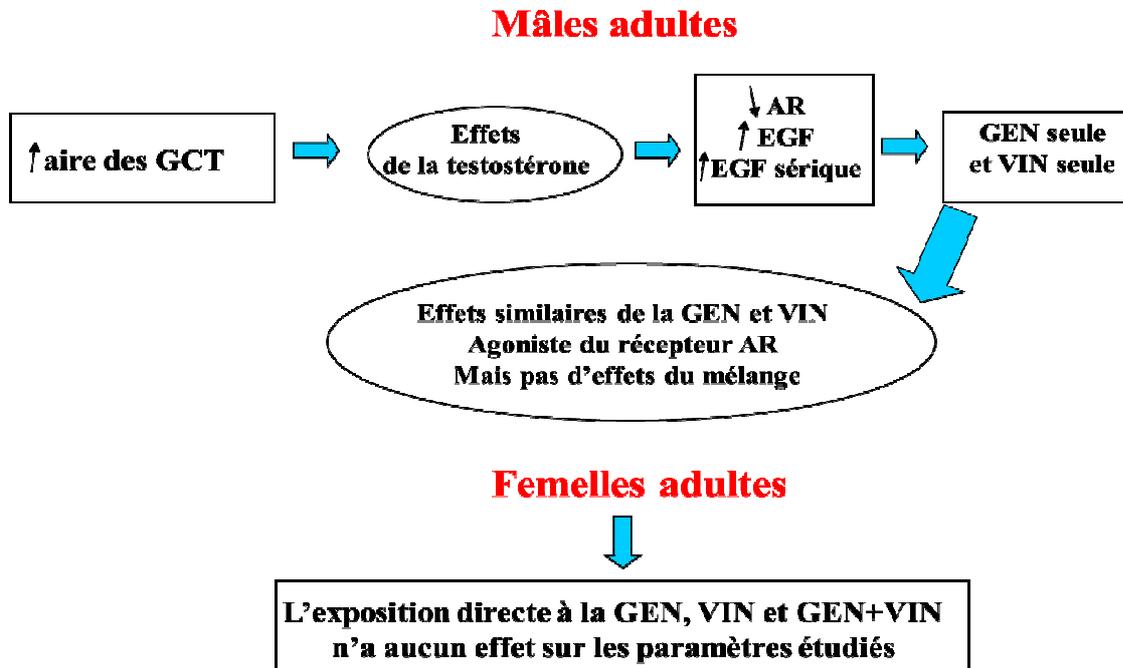


Figure 60 : Récapitulatif de l'exposition directe du sevrage à l'âge adulte

Nos résultats soulignent également l'insensibilité apparente des femelles à ce type d'exposition, tant par l'absence de réponse au niveau de la préférence au sucré qu'au niveau des structures salivaires. Ces résultats sont quelque peu surprenants puisque la littérature mentionne l'influence des oestrogènes dans la diminution de la préférence au sucré pendant la gestation (Duffy et al., 1998) et que plusieurs travaux font état de l'action des phytoestrogènes sur les structures des glandes salivaires ou sur l'homéostasie buccale chez la femme (Carvalho et al., 2011 ; Giuca et al., 2009). Toutefois, il faudrait compléter cette étude par une évaluation des fonctions exocrines, car ce sont elles qui sont surtout impliquées dans le maintien de l'homéostasie buccale.

En tout état de cause, cette étude d'exposition du sevrage à l'âge adulte montre que la sensibilité de la glande submandibulaire aux perturbateurs endocriniens n'est pas limitée au stade immature ; elle identifie des effets similaires de la génistéine et de la vinclozoline, mais elles n'agissent plus en synergie, comme c'était le cas lors de l'exposition précoce.

DISCUSSION
GENERALE
ET
CONCLUSION

Pris dans son ensemble, ce travail amène de nouvelles données montrant pour la première fois, que les glandes salivaires peuvent être une cible des PE. L'impact d'une exposition à la génistéine et/ou à la vinclozoline sur la glande submandibulaire varie selon le statut physiologique et les conditions de l'exposition. La première étude concernant l'exposition gestationnelle et lactationnelle révèle des réponses différentes selon l'âge et selon le sexe. En général, chez les animaux immatures on assiste à des altérations histologiques et moléculaires plus prononcées au niveau du groupe mélange, alors que chez les animaux adultes on assiste à des altérations de la glande SM similaires avec une exposition à la génistéine, à la vinclozoline seule et au mélange des deux. Notre approche, basée sur l'utilisation de deux types d'exposition spécifiques et à différents stades du développement, nous a permis d'identifier des effets sur la morphogénèse de la glande en liaison avec des altérations de l'expression des gènes représentatifs des sécrétions endocrines (facteurs de croissance) et exocrines (protéines gustatives) et un effet sur les préférences gustatives particulièrement ciblé chez les mâles lors de l'exposition précoce.

En ce qui concerne l'impact de l'exposition aux xénohormones *in utero* et au cours de la lactation sur les glandes submandibulaires, nos travaux montrent un effet spécifique aux mâles immatures : l'augmentation de la préférence au sucré avec les molécules seules ou en mélange. Ce résultat est d'ailleurs en accord avec nos précédentes études (Bergès et al., 2008). L'exposition précoce à des molécules de types PE induit une féminisation du comportement alimentaire des mâles de la même manière que ce qui est obtenu avec un mélange de PCB (Hany et al., 1999), avec le bisphenol A (Xu et al., 2011), le prochloraz (Vinggaard et al., 2006) et la vinclozoline (Flynn et al., 2001). Nos résultats sont cependant en contradiction avec ceux de Flynn et al (2000) qui ne montrent aucun effet de la génistéine sur les préférences au sucré chez les rats mâles. Il est difficile de conclure quant à ces données de la littérature surtout que la plupart des constatations ont été faites sur des animaux dont l'âge dépasse les 70 jours postnatal et donc considérés comme des adultes.

Curieusement notre étude montre que les effets sur la préférence au sucré chez le rat jeune disparaissent à l'âge adulte, de la même manière que disparaissent les effets sur les structures et les sécrétions exocrines des glandes salivaires. Cependant les effets de l'exposition précoce sur les fonctions endocrines des glandes salivaires persistent jusqu'à l'âge adulte où l'expression de tous les facteurs de croissance chute brutalement quelques soient les traitements. Nous avons noté aussi une différence de réponse entre les mâles immatures et les mâles adultes dans l'expression des facteurs de croissance. Elle n'augmente qu'avec le mélange chez les immatures alors qu'elle diminue au contraire chez les adultes avec les molécules seules ou en mélange. Cette différence de réponse entre le stade immature et le stade adulte pourrait s'expliquer par le fait que les animaux adultes ont

un taux d'hormones beaucoup plus important, qui régule au quotidien les fonctions exocrines alors que les effets observés sur les récepteurs hormonaux et les facteurs de croissance résultent de l'interaction entre les molécules et le patrimoine génétique de l'organe (la glande SM) : c'est le phénomène de programmation génétique. Ces résultats observés chez le mâle rappellent ceux obtenus suite à la même exposition sur les gonades mâles (Eustache et al., 2009).

Les effets de l'exposition précoce au niveau de la glande SM des femelles sont à l'opposé de ceux observés chez le mâle et cela peut être dû au dimorphisme sexuel de la glande. Chez les femelles, contrairement aux animaux mâles, on assiste à un avancement de la maturation de la glande, avec une diminution générale de l'expression de tous les facteurs de croissance plus prononcée au niveau du groupe mélange et une augmentation des mêmes facteurs avec tous les traitements. Une étude de la morphogénèse de la glande mammaire menée en parallèle par d'autres collaborateurs à ce projet identifie également des effets sur la morphogénèse de la glande mammaire qui sont étroitement associés au statut hormonal et à l'apparition de la puberté (El Sheick Saad, 2011). Pris dans leur ensemble, ces résultats obtenus sur la glande salivaire et sur la glande mammaire chez la femelle soulignent l'importance de l'expression des récepteurs hormonaux et des facteurs de croissance dans les processus de morphogénèse et peuvent être relié au dimorphisme sexuel que l'on connaît pour chacune de ces deux glandes.

La deuxième étude relative à l'exposition du sevrage jusqu'à l'âge adulte c'est-à-dire, une exposition directe sans passer par la mère, permet de discriminer des effets propres à une action sur la morphogénèse et/ou à la programmation fœtale de ceux propres à une régulation directe des fonctions physiologiques. Curieusement les effets observés lors de cette étude ne concernent que les glandes SM des mâles et révèlent des altérations histologiques couplées à une augmentation de l'expression de l'EGF, dans la glande elle-même et aussi dans la circulation sanguine. Tous les effets sont observés seulement avec les molécules seules et aucun effet du mélange n'a été noté lors de cette deuxième étude. L'exposition directe semble donc faire intervenir d'autres mécanismes d'action différents de ceux de l'exposition *in utero* et lactationnelle, puisqu'au même stade J100 on observe des effets complètement opposés.

Ces travaux sont d'autant plus importants qu'ils concernent plus particulièrement la sécurité alimentaire. En effet, en considérant nos résultats, on peut imaginer que des bébés qui absorbent une alimentation renfermant des xénohormones (phyto-oestrogènes, résidus de pesticides, plastiques...) puissent être orientés dans leurs préférences gustatives. Seules des études épidémiologiques pourraient permettre de vérifier s'il existe un risque

d'augmentation de la préférence au goût sucré chez ces enfants. Mais rien n'exclut que ces effets s'accompagnent simultanément d'une action sur d'autres fonctions physiologiques et métaboliques et participent au développement des processus obésogènes pour lesquels les perturbateurs endocriniens sont souvent incriminés. Aussi est-il capital d'essayer d'en savoir davantage sur les effets potentiels chez l'enfant, même s'il s'agit d'une approche difficile à mettre en place.

Ces données présentent un intérêt particulier en matière de sécurité alimentaire puisqu'elles sont obtenues dans des conditions d'exposition alimentaire (faibles doses) et de ce fait il serait possible de les transposer à l'homme.

Ces travaux présentent également un intérêt pour les personnes âgées, les femmes en ménopause, voire certains patients. Certes différentes, ces populations ont en commun d'être souvent confrontées au problème de sécheresse buccale. Or on sait que la chute des hormones ou une altération de l'équilibre endocrinien peut en être la cause principale, entraînant alors une moins bonne efficacité des glandes salivaires et de leurs sécrétions. Des mesures de nutrithérapies visant à orienter l'alimentation de ces personnes vers des mets riches ou dépourvus, selon le cas, en phyto-oestrogènes par exemple, pourraient alors être envisagées afin de rétablir une composition et un flux salivaires nécessaires à de bonnes perceptions sensorielles. Mais avant tout, il est indispensable d'approfondir nos connaissances dans ce domaine.

PERSPECTIVES

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

- Suivre l'évolution d'autres protéines salivaires hormono-régulées et impliquées dans la perception sensorielle et gustative comme l'alpha amylase et certaines kalicréines, mais aussi des peroxydases qui sont impliquées dans le pouvoir tampon de la salive et dans le maintien de l'homéostasie buccale. .
- Compléter l'approche moléculaire des effets observés au niveau de tous les gènes de la glande salivaire via une approche génomique et protéomique.
- Préciser les effets observés lors de la première exposition gestationnelle et lactationnelle par une étude cinétique de la morphogenèse des glandes submandibulaires sous l'action des traitements et d'approfondir l'étude morphométrique en reprenant les stades de développement les plus sensibles à la génistéine et/ou à la vinclozoline : J25, J50 et J100. L'expérimentation animale a été déjà effectuée et les échantillons prélevés. Une partie de la glande SM a été réservée pour la microscopie électronique, qui pourrait nous donner plus de détails quant aux granules de sécrétions de la SM et nous renseignerait sur les altérations ultrastructurales.
- L'analyse des effets potentiels sur les glandes sublinguales et sur les parotides, qui ont également été prélevées au cours de ces expositions, ce qui permettrait d'évaluer les effets en fonction du type de sécrétions (muqueux vs séromuqueux).

Il serait aussi intéressant de voir les effets de mélange avec d'autres molécules de type perturbateurs endocriniens, comme le Bisphenol A présents dans certaines résines dentaires comme celles utilisées pour combler les caries. Une étude menée en parallèle au sein de l'unité vient de montrer l'impact du BPA sur la sécheresse buccale chez le rat adulte (Folia et al., 2012, sous presse). De ce fait cette étude pourrait être d'un grand intérêt au niveau de la santé orale.

Enfin, nous envisageons de compléter ces travaux par une étude *in vitro*, en utilisant des lignées de cellules de glandes submandibulaires humaines, afin de mieux comprendre les mécanismes d'actions par lequel agissent les perturbateurs endocriniens, tant sur les processus de différenciation des acini qu'au niveau de la régulation de l'expression génique.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition du régime semi-purifié L5

Régime semi-purifié L5 synthétisé par l'UPAE INRA (Jouy-en-Josas, France) :

Ingrédients	Quantité (g/Kg)
Caséine	180
Amidon de froment	460
Cellulose	20
Sucrose	230
Huile de germe de maïs	50
Mélange vitaminique ^a	10
Mélange minéral ^b	50

^a contenu en mg/kg de mélange : acétate de rétinol (500 UI/mg), 1000 ; cholécalciférol (500 UI/mg), 250 ; acétate de DL- α -tocophérol (0,5 UI/mg), 2000 ; phylloquinone ou ménadione, 100 ; chlorhydrate de thiamine, 1000 ; riboflavine, 1000 ; acide nicotinique, 5000, D-pantothénate de calcium, 2500 ; chlorhydrate de pyridoxine, 1000 ; inositol, 1000 ; D-biotine, 20 ; acide folique, 200 ; cyanocobalamine, 2,5 ; acide p-aminobenzoïque, 5000 ; chlorhydrate de choline, 100000 ; sucrose, 549450.

^b contenu en g/kg de mélange : CaHPO₄, 215 ; K₂HPO₄, 215 ; CaCO₃, 240 ; MgSO₄, 7H₂O, 100 ; NaCl, 60 ; MgO, 40 ; FeSO₄, 7H₂O, 8 ; ZnSO₄, 7H₂O, 7 ; CuSO₄, 5H₂O, 1 ; CoCO₃, 0.0005 ; Na₂SeO₃, 0.015 ; MnSO₄, H₂O, 2 ; Na₂SiO₇, 3H₂O, 0.5 ; AlK(SO₄)₂, 12H₂O, 0.2 ; K₂CrO₄, 0.15 ; NaF, 0.1 ; NiSO₄, 6H₂O, 0.1 ; H₂BO₃, 0.1 ; COSO₄, 7H₂O, 0.05 ; KIO₃, 0.04 ; (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 4H₂O, 0.02 ; LiCl, 0.015 ; NH₄VO₃, 0.01.

Annexe 2 : Dosage de l'EGF sérique, Kit ELISA PeproTech

Reconstitution :

Anticorps : 11µg d'AC purifié de lapin anti-rat + 0.5mg d-Mannitol (Centrifuger avant ouverture).

Reconstituer dans 110µl d'eau distillé pour avoir une concentration finale de 100µg/ml.

Détection d'AC : 21µg de biotinyll + AG purifié de lapin anti-rat 0.5mg d-Mannitol (Centrifuger avant ouverture).

Reconstituer dans 1ml d'eau distillé pour avoir une concentration de 1 µg/ml.

Remarque : Les solutions reconstituées sont stables deux semaines à 2-8°C, ou bien six mois à -20°C.

Solutions à préparer :

Toutes les solutions doivent être sorties du congélateur avant utilisation (à température ambiante)

- PBS : diluer 10×PBS à 1×PBS, pH 7.2 dans l'eau stérile
- Tampon de lavage : 0.05% Tween-20 dans PBS
- Tampon de blocage : filtrer avec un filtre stérile 1% BSA dans PBS
- Diluant AC : 0.05% Tween-20 + 0.1% BSA dans PBS

Préparation de la plaque :

- Diluer l'AC avec du PBS pour avoir une concentration de 0.5µg/ml (110µl AC dans 22ml). Ajouter 100µl dans chaque puits de la plaque. Fermer la plaque et laisser agir toute une nuit à température ambiante.
- Aspirer le liquide et laver 4 fois avec 300µl du tampon de lavage.
- Rajouter 300µl par puits du tampon de blocage et incubé 1h à température ambiante.
- Aspirer et laver 4 fois.

Protocole ELISA :

Standards/Echantillons : diluer le standard afin d'obtenir une courbe standard de 1ng/ml>>>>>>0 comme le tableau ci suit

Concentrations du standard (ng/ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Volume du Standard (ml)	300	240	180	120	60	0
Volume du diluant à rajouter (ml)	0	60	120	180	240	300

Rajouter immédiatement 100µl de chaque standard et des échantillons (sérums) dans les puits en triplicate

Incuber à température ambiante pendant 2h.

Détection de l'AC : Aspirer et laver 4 fois la plaque, diluer (detection AC) dans le diluant pour avoir une concentration de 1µg/ml.

Rajouter immédiatement 100µL dans les puits

Incuber à température ambiante pendant 2h.

Avidin-HRP conjugué : Aspirer et laver 4fois, diluer 5.5µl avidin-HRP conjugué au 1/2000 éme dans le diluant pour avoir un volume de 11ml.

Rajouter immédiatement 100µl dans les puits

Incuber à température ambiante pendant 30min

Substrat ABTS : Aspirer et laver 4 fois,

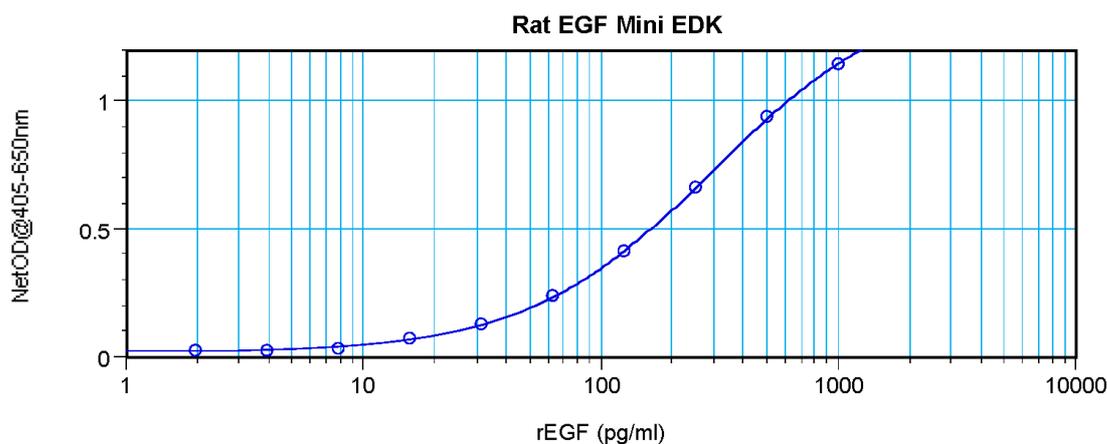
Rajouter immédiatement 100µl de la solution substrat ABTS dans les puits

Incuber à température ambiante jusqu'à l'apparition d la coloration (Verte)

Mettre au lecteur de plaque (longueur d'onde 405nm avec une correction de 650nm)

Remarque : les valeurs de DO lues pour le standard 0 (blanc) ne doivent pas dépasser 0.2 unité et celles du standard le plus élevé ne doivent pas dépasser 1.2.

La lecture se fait en cinétique : la plaque doit être lue chaque 5 minute pour un total de 20 minutes.



Courbe standard du dosage EGF

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abe, K., & Dawes, C. (1982). Dopamine-induced secretion of protein and of some electrolytes by rat submandibular and parotid glands. *Arch Oral Biol*, 27(8), 635-643.

Actis, A. B. (2005). A hypothesis to relate salivary tumors with mammary and prostate neoplasias. *Bioinformation*, 1(1), 12-13.

Adlercreutz, H., Fotsis, T., Kurzer, M. S., Wahala, K., Makela, T., & Hase, T. (1995). Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of unconjugated lignans and isoflavonoids in human feces, with preliminary results in omnivorous and vegetarian women. *Anal Biochem*, 225(1), 101-108.

Afsset (2006). Document de Référence : pour La construction d'une valeur toxicologique de référence fondée sur des effets reprotoxiques MAISONS-ALFORT.

Al-Hashimi, I., & Levine, M. J. (1989). Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Arch Oral Biol*, 34(4), 289-295.

Allera, A., Lo, S., King, I., Steglich, F., & Klingmuller, D. (2004). Impact of androgenic/antiandrogenic compounds (AAC) on human sex steroid metabolizing key enzymes. *Toxicology*, 205(1-2), 75-85.

Alleva, E., Aloe, L., & Bigi, S. (1993). An updated role for nerve growth factor in neurobehavioural regulation of adult vertebrates. *Rev Neurosci*, 4(1), 41-62.

Allred, C. D., Allred, K. F., Ju, Y. H., Virant, S. M., & Helferich, W. G. (2001). Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res*, 61(13), 5045-5050.

Aloe, L., Alleva, E., Bohm, A., & Levi-Montalcini, R. (1986). Aggressive behavior induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(16), 6184-6187.

- Amano, O., & Iseki, S. (1998). Occurrence and nuclear localization of cAMP response element-binding protein in the post-natal development of the rat submandibular gland. *Histochem J*, *30*(8), 591-601.
- Amano, O., Matsumoto, K., Nakamura, T., & Iseki, S. (1994). Expression and localization of hepatocyte growth factor in rat submandibular gland. *Growth Factors*, *10*(2), 145-151.
- Amano, O., Tsuji, T., Nakamura, T., & Iseki, S. (1991). Expression of transforming growth factor beta 1 in the submandibular gland of the rat. *J Histochem Cytochem*, *39*(12), 1707-1711.
- Amerongen, A. V., & Veerman, E. C. (2002). Saliva--the defender of the oral cavity. *Oral Dis*, *8*(1), 12-22.
- Andres, S., Abraham, K., Appel, K. E., & Lampen, A. (2011). Risks and benefits of dietary isoflavones for cancer. *Crit Rev Toxicol*, *41*(6), 463-506.
- Antakly, T., Zhang, C. X., Sarrieau, A., & Raquidan, D. (1991). Cell-specific expression of the glucocorticoid receptor within granular convoluted tubules of the rat submaxillary gland. *Endocrinology*, *128*(1), 617-622.
- Anway, M. D., Rekow, S. S., & Skinner, M. K. (2008). Transgenerational epigenetic programming of the embryonic testis transcriptome. *Genomics*, *91*(1), 30-40.
- Aps, J. K., & Martens, L. C. (2005). Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int*, *150*(2-3), 119-131.
- Arai, Y., Mori, T., Suzuki, Y., & Bern, H. A. (1983). Long-term effects of perinatal exposure to sex steroids and diethylstilbestrol on the reproductive system of male mammals. *Int Rev Cytol*, *84*, 235-268.
- Arancibia, S., & Assenmacher, I. (1985). [Submaxillary glands in an endocrine context]. *J Biol Buccale*, *13*(3), 185-203.

Arcieri, R. M., & Martinelli, C. (1977). Influence of salivary glands extirpation on procreation in rats. *Tohoku J Exp Med*, 121(2), 105-110.

Atanassova, N., McKinnell, C., Turner, K. J., Walker, M., Fisher, J. S., Morley, M., Millar, M. R., Groome, N. P., & Sharpe, R. M. (2000). Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology*, 141(10), 3898-3907.

Atkinson, J. C., Travis, W. D., Pillemer, S. R., Bermudez, D., Wolff, A., & Fox, P. C. (1990). Major salivary gland function in primary Sjogren's syndrome and its relationship to clinical features. *J Rheumatol*, 17(3), 318-322.

Audie, J. P., Janin, A., Porchet, N., Copin, M. C., Gosselin, B., & Aubert, J. P. (1993). Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*, 41(10), 1479-1485.

Aune, T. M., & Thomas, E. L. (1977). Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *Eur J Biochem*, 80(1), 209-214.

Awoniyi, C. A., Roberts, D., Veeramachaneni, D. N., Hurst, B. S., Tucker, K. E., & Schlaff, W. D. (1998). Reproductive sequelae in female rats after in utero and neonatal exposure to the phytoestrogen genistein. *Fertil Steril*, 70(3), 440-447.

Bacon, J. R., & Rhodes, M. J. (2000). Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *J Agric Food Chem*, 48(3), 838-843.

Baisset, A., Commanay, L., & Montastruc, P. (1962). [Action of the antidiuretic hormone on salivary secretion]. *Rev Fr Etud Clin Biol*, 7, 938-948.

Bajari, T. M., Nimpf, J., & Schneider, W. J. (2004). Role of leptin in reproduction. *Curr Opin Lipidol*, 15(3), 315-319.

- Ball, W. D. (1974). Development of the rat salivary glands. 3. Mesenchymal specificity in the morphogenesis of the embryonic submaxillary and sublingual glands of the rat. *J Exp Zool*, 188(3), 277-288.
- Bardow, A., Moe, D., Nyvad, B., & Nauntofte, B. (2000). The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO₂. *Arch Oral Biol*, 45(1), 1-12.
- Barka, T. (1980). Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J Histochem Cytochem*, 28(8), 836-859.
- Barreiro, M. L., & Tena-Sempere, M. (2004). Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol Cell Endocrinol*, 226(1-2), 1-9.
- Barrenetxe, J., Delagrangue, P., & Martinez, J. A. (2004). Physiological and metabolic functions of melatonin. *J Physiol Biochem*, 60(1), 61-72.
- Barthe, P. L., Bullock, L. P., Mowszowicz, I., Bardin, C. W., & Orth, D. N. (1974). Submaxillary gland epidermal growth factor: a sensitive index of biologic androgen activity. *Endocrinology*, 95(4), 1019-1025.
- Basly, J. P., & Lavier, M. C. (2005). Dietary phytoestrogens: potential selective estrogen enzyme modulators? *Planta Med*, 71(4), 287-294.
- Baumeister, M., Steep, M., Dieckmann, S., Melzer, O., Kloppel, H., Jurling, H., & Bender, L. (2002). Transfer of the fungicide vinclozolin from treated to untreated plants via volatilization. *Chemosphere*, 48(1), 75-82.
- Berg, T., Johansen, L., & Nustad, K. (1985). Enzymatic activity of rat submandibular gland kallikrein released into blood. *Am J Physiol*, 249(6 Pt 2), H1134-1142.
- Bergdahl, M. (2000). Salivary flow and oral complaints in adult dental patients. *Community Dent Oral Epidemiol*, 28(1), 59-66.

Bergès, R., Issanchou, S., & Canivenc-Lavier, M. C. (2008). Xéno-hormone exposure during pregnancy and lactation modify sweet preference of male but not female offspring. *Appetite*, 51(2), 353.

Bergman, A., Brandt, I., & Brouwer, B. (1996). European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife. Reports of Proceedings. *Environment and Climate Research Programme of DG XII of the European Commission*. Weybridge.

Bigi, S., Huber, C., De Acetis, L., Alleva, E., & Dixon, A. K. (1994). Removal of the submaxillary salivary glands first increases and then abolishes the agonistic response of male mice in repeated social encounters. *Physiol Behav*, 55(1), 13-19.

Bigi, S., Maestripieri, D., Aloe, L., & Alleva, E. (1992). NGF decreases isolation-induced aggressive behavior, while increasing adrenal volume, in adult male mice. *Physiol Behav*, 51(2), 337-343.

Blum, A., & Cannon, R. O., 3rd (1998). Effects of oestrogens and selective oestrogen receptor modulators on serum lipoproteins and vascular function. *Curr Opin Lipidol*, 9(6), 575-586.

Bodner, L., & Gorsky, M. (1996). Parotid gland secretion of the aging rat. *Arch Gerontol Geriatr*, 22(1), 63-69.

Bodner, L., Knyszynski, A., Adler-Kunin, S., & Danon, D. (1991). The effect of selective desalivation on wound healing in mice. *Exp Gerontol*, 26(4), 357-363

Bonnans, S. R., & Noble, A. C. (1995). Interaction of salivary flow with temporal perception of sweetness, sourness, and fruitiness. *Physiol Behav*, 57(3), 569-574.

Borghese, E. (1950). The development in vitro of the submandibular and sublingual glands of *Mus musculus*. *J Anat*, 84(3), 287-302.

Bosch, J. A., Brand, H. S., Ligtenberg, T. J., Bermond, B., Hoogstraten, J., & Nieuw Amerongen, A. V. (1996). Psychological stress as a determinant of protein levels and

salivary-induced aggregation of *Streptococcus gordonii* in human whole saliva. *Psychosom Med*, 58(4), 374-382.

Bosch, J. A., Turkenburg, M., Nazmi, K., Veerman, E. C., de Geus, E. J., & Nieuw Amerongen, A. V. (2003). Stress as a determinant of saliva-mediated adherence and coadherence of oral and nonoral microorganisms. *Psychosom Med*, 65(4), 604-612.

Bossola, M., & Tazza, L. (2012). Xerostomia in patients on chronic hemodialysis. *Nat Rev Nephrol*, 8(3), 176-182.

Boyer, R., Jame, F., & Arancibia, S. (1991). [A non-exocrine function of the submaxillary gland]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 52(5), 307-322.

Boyer, R., Tapia-Arancibia, L., Alonso, G., & Arancibia, S. (1988). Decrease of hypothalamic TRH levels but not plasmatic TSH levels after ablation of submandibular salivary glands in the rat. *J Biol Buccale*, 16(2), 69-74.

Brandtzaeg, P., Gautvik, K. M., Nustad, K., & Pierce, J. V. (1976). Rat submandibular gland kallikreins: purification and cellular localization. *Br J Pharmacol*, 56(2), 155-167.

Breinholt, V., & Larsen, J. C. (1998). Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. *Chem Res Toxicol*, 11(6), 622-629.

Brevini, T. A., Zanetto, S. B., & Cillo, F. (2005). Effects of endocrine disruptors on developmental and reproductive functions. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 5(1), 1-10.

Buckley, J., Willingham, E., Agras, K., & Baskin, L. S. (2006). Embryonic exposure to the fungicide vinclozolin causes virilization of females and alteration of progesterone receptor expression in vivo: an experimental study in mice. *Environ Health*, 5, 4.

Bueker, E. D., Weis, P., & Schenkein, I. (1965). Sexual Dimorphism of Mouse Submaxillary Glands and Its Relationship to Nerve Growth Stimulating Protein. *Proc Soc Exp Biol Med*, 118, 204-207.

- Bursztyka, J., Debrauwer, L., Perdu, E., Jouanin, I., Jaeg, J. P., & Cravedi, J. P. (2008). Biotransformation of vinclozolin in rat precision-cut liver slices: comparison with in vivo metabolic pattern. *J Agric Food Chem*, 56(12), 4832-4839.
- Busby, M. G., Jeffcoat, A. R., Bloedon, L. T., Koch, M. A., Black, T., Dix, K. J., Heizer, W. D., Thomas, B. F., Hill, J. M., Crowell, J. A., & Zeisel, S. H. (2002). Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. *Am J Clin Nutr*, 75(1), 126-136.
- Butera, P. C. (2010). Estradiol and the control of food intake. *Physiol Behav*, 99(2), 175-180.
- Byun, J. S., & Lee, S. S. (2010). Effect of soybeans and sword beans on bone metabolism in a rat model of osteoporosis. *Ann Nutr Metab*, 56(2), 106-112.
- Byyny, R. L., Orth, D. N., Cohen, S., & Doyne, E. S. (1974). Epidermal growth factor: effects of androgens and adrenergic agents. *Endocrinology*, 95(3), 776-782.
- Campbell, P. S., Ben-Aryeh, H., & Swanson, K. A. (1990). Differential distribution of an estrogen receptor in the submandibular and parotid salivary glands of female rats. *Endocr Res*, 16(3), 333-345.
- Caporossi, L., Santoro, A., & Papaleo, B. (2010). Saliva as an analytical matrix: state of the art and application for biomonitoring. *Biomarkers*, 15(6), 475-487.
- Carvalho, V. D., Silveira, V. A., do Prado, R. F., & Carvalho, Y. R. (2011). Effect of estrogen therapy, soy isoflavones, and the combination therapy on the submandibular gland of ovariectomized rats. *Pathol Res Pract*, 207(5), 300-305.
- Cassidy, A., Brown, J. E., Hawdon, A., Faughnan, M. S., King, L. J., Millward, J., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B., & Setchell, K. D. (2006). Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *J Nutr*, 136(1), 45-51.

Cassone, V. M., Warren, W. S., Brooks, D. S., & Lu, J. (1993). Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *J Biol Rhythms*, 8 Suppl, S73-81.

Chan, M., & Bennick, A. (2001). Proteolytic processing of a human salivary proline-rich protein precursor by proprotein convertases. *Eur J Biochem*, 268(12), 3423-3431.

Chatterton, R. T., Jr., Vogelsong, K. M., Lu, Y. C., Ellman, A. B., & Hudgens, G. A. (1996). Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol*, 16(4), 433-448.

Chavez, E. M., Taylor, G. W., Borrell, L. N., & Ship, J. A. (2000). Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 89(3), 305-311.

Cheek, D. B. (1971). Hormonal and nutritional factors influencing muscle cell growth. *J Dent Res*, 50(6), 1385-1391.

Chey, W. Y., & Chang, T. M. (2003). Secretin, 100 years later. *J Gastroenterol*, 38(11), 1025-1035.

Chretien, M. (1977). Action of testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ: the submaxillary gland of the mouse. *Int Rev Cytol*, 50, 333-396.

Christensen, C. M., Brand, J. G., & Malamud, D. (1987). Salivary changes in solution pH: a source of individual differences in sour taste perception. *Physiol Behav*, 40(2), 221-227.

Christiansen, S., Scholze, M., Dalgaard, M., Vinggaard, A. M., Axelstad, M., Kortenkamp, A., & Hass, U. (2009). Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens. *Environ Health Perspect*, 117(12), 1839-1846.

Clarke, D. B., Barnes, K. A., Castle, L., Rose, M., Wilson, L. A., Baxter, M. J., Price, K. R., & DuPont, M. S. (2003). Levels of phytoestrogens, inorganic trace-elements, natural toxicants and nitrate in vegetarian duplicate diets. *Food Chemistry*, 81(2), 287-300.

Cohen, R. E., Aguirre, A., Neiders, M. E., Levine, M. J., Jones, P. C., Reddy, M. S., & Haar, J. G. (1990). Immunochemistry of high molecular-weight human salivary mucin. *Arch Oral Biol*, 35(2), 127-136.

Cohen, S., & Elliott, G. A. (1989). The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. 1962. *J Invest Dermatol*, 92(4 Suppl), 157S; discussion 158S-159S.

Colborn, T., vom Saal, F. S., & Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*, 101(5), 378-384.

Cossu, M., & Lantini, M. S. (1996). Ultrastructural localization of blood group antigens in human salivary glands. *Eur J Morphol*, 34(3), 191-195.

Costa, P. T., Jr., Chauncey, H. H., Rose, C. L., & Kapur, K. K. (1980). Relationship of parotid saliva flow rate and composition with personality traits in healthy men. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 50(5), 416-422.

Cotroneo, M. S., Wang, J., Eltoum, I. A., & Lamartiniere, C. A. (2001). Sex steroid receptor regulation by genistein in the prepubertal rat uterus. *Mol Cell Endocrinol*, 173(1-2), 135-145.

Cravedi, J. P., Zalko, D., Savouret, J. F., Menuet, A., & Jegou, B. (2007). [The concept of endocrine disruption and human health]. *Med Sci (Paris)*, 23(2), 198-204.

Crews, D., Gore, A. C., Hsu, T. S., Dangleben, N. L., Spinetta, M., Schallert, T., Anway, M. D., & Skinner, M. K. (2007). Transgenerational epigenetic imprints on mate preference. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(14), 5942-5946.

Curtis, K. S., Davis, L. M., Johnson, A. L., Therrien, K. L., & Contreras, R. J. (2004). Sex differences in behavioral taste responses to and ingestion of sucrose and NaCl solutions by rats. *Physiol Behav*, 80(5), 657-664.

D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., & Samperi, R. (2003). Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci Total Environ*, 302(1-3), 199-209.

De Matteis, R., Puxeddu, R., Riva, A., & Cinti, S. (2002). Intralobular ducts of human major salivary glands contain leptin and its receptor. *J Anat*, 201(5), 363-370.

de Rijk, E. P., Ravesloot, W. T., Hafmans, T. G., & van Esch, E. (2003). Multifocal ductal cell hyperplasia in the submandibular salivary glands of Wistar rats chronically treated with a novel steroidal compound. *Toxicol Pathol*, 31(1), 1-9.

De Vries, G. J., & Villalba, C. (1997). Brain sexual dimorphism and sex differences in parental and other social behaviors. *Ann N Y Acad Sci*, 807, 273-286.

de Wijk, R. A., Prinz, J. F., Engelen, L., & Weenen, H. (2004). The role of alpha-amylase in the perception of oral texture and flavour in custards. *Physiol Behav*, 83(1), 81-91.

De Wilde, P. C., Baak, J. P., van Houwelingen, J. C., Kater, L., & Slootweg, P. J. (1986). Morphometric study of histological changes in sublabial salivary glands due to aging process. *J Clin Pathol*, 39(4), 406-417.

Delwiche, J., & O'Mahony, M. (1996). Changes in secreted salivary sodium are sufficient to alter salt taste sensitivity: use of signal detection measures with continuous monitoring of the oral environment. *Physiol Behav*, 59(4-5), 605-611.

Denny, P. C., Denny, P. A., Klauser, D. K., Hong, S. H., Navazesh, M., & Tabak, L. A. (1991). Age-related changes in mucins from human whole saliva. *J Dent Res*, 70(10), 1320-1327.

Deville de Periere, D., & Arancibia, S. (1988). [Salivary hormones: a new aspect of oral physiology]. *J Physiol (Paris)*, 83(4), 273-280.

Devoize, L., & Dallel, R. (2010). Salivation. *EMC (Elsevier Masson SAS) Médecine buccale 28-150-M-10*(<http://www.em-consulte.com/article/250821/salivation>).

- Dhananjayan, M. R., Erhardt, P. W., & Corbitt, C. (2006). Simultaneous determination of vinclozolin and detection of its degradation products in mouse plasma, serum and urine, and from rabbit bile, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, *1115*(1-2), 8-18.
- Dimery, I. W., Jones, L. A., Verjan, R. P., Raymond, A. K., Goepfert, H., & Hong, W. K. (1987). Estrogen receptors in normal salivary gland and salivary gland carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, *113*(10), 1082-1085.
- Dodds, M. W., Johnson, D. A., & Yeh, C. K. (2005). Health benefits of saliva: a review. *J Dent*, *33*(3), 223-233.
- Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Chang, H. C., Newbold, R. R., & Delclos, K. B. (2001). Placental transfer of the soy isoflavone genistein following dietary and gavage administration to Sprague Dawley rats. *Reprod Toxicol*, *15*(2), 105-110.
- Dolce, C., Anguita, J., Brinkley, L., Karnam, P., Humphreys-Beher, M., Nakagawa, Y., Keeling, S., & King, G. (1994). Effects of sialoadenectomy and exogenous EGF on molar drift and orthodontic tooth movement in rats. *Am J Physiol*, *266*(5 Pt 1), E731-738.
- Dowd, F. J. (1999). Saliva and dental caries. *Dent Clin North Am*, *43*(4), 579-597.
- Dreizen, S., Mann, A. W., & et al. (1946). The buffer capacity of saliva as a measure of dental caries activity. *J Dent Res*, *25*, 213-222.
- Duffy, V. B., Bartoshuk, L. M., Striegel-Moore, R., & Rodin, J. (1998). Taste changes across pregnancy. *Ann N Y Acad Sci*, *855*, 805-809.
- Edgar, W. M., Higham, S. M., & Manning, R. H. (1994). Saliva stimulation and caries prevention. *Adv Dent Res*, *8*(2), 239-245.
- El Sheikh Saad, H., Meduri, G., Phrakonkham, P., Berges, R., Vacher, S., Djallali, M., Auger, J., Canivenc-Lavier, M. C., & Perrot-Applanat, M. (2011). Abnormal peripubertal

development of the rat mammary gland following exposure in utero and during lactation to a mixture of genistein and the food contaminant vinclozolin. *Reprod Toxicol*, 32(1), 15-25.

Elzeinova, F., Novakova, V., Buckiova, D., Kubatova, A., & Peknicova, J. (2008). Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice. *Reprod Toxicol*, 26(3-4), 231-238.

Enberg, N., Alho, H., Loimaranta, V., & Lenander-Lumikari, M. (2001). Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 92(3), 292-298.

Engelen, L., de Wijk, R. A., Prinz, J. F., van der Bilt, A., & Bosman, F. (2003). The relation between saliva flow after different stimulations and the perception of flavor and texture attributes in custard desserts. *Physiol Behav*, 78(1), 165-169.

Enmark, E., & Gustafsson, J. A. (1998). [Newly discovered estrogen receptor. New therapeutic possibilities in postmenopausal symptoms, osteoporosis, cancer of the breast and prostate]. *Lakartidningen*, 95(17), 1945-1949.

EPA. (2010). Reference Dose (RfD): Description and Use in Health Risk Assessments.

European Food Safety Authority, E. (2010). Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal*, 8, [442 pp.].

Eustache, F., Mondon, F., Canivenc-Lavier, M. C., Lesaffre, C., Fulla, Y., Berges, R., Cravedi, J. P., Vaiman, D., & Auger, J. (2009). Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environ Health Perspect*, 117(8), 1272-1279.

Faure, E. D., Chantre, P., & Mares, P. (2002). Effects of a standardized soy extract on hot flashes: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause*, 9(5), 329-334.

Fernley, R. T., Wright, R. D., & Coghlan, J. P. (1979). A novel carbonic anhydrase from the ovine parotid gland. *FEBS Lett*, 105(2), 299-302.

Ferry, A. L., Mitchell, J. R., Hort, J., Hill, S. E., Taylor, A. J., Lagarrigue, S., & Valles-Pamies, B. (2006). In-mouth amylase activity can reduce perception of saltiness in starch-thickened foods. *J Agric Food Chem*, *54*(23), 8869-8873.

Flynn, E. A., Yelland, K. T., & Shklar, G. (1983). Effect of estradiol on ultrastructure of granular ducts in submandibular glands of female rats. *Anat Rec*, *206*(1), 23-30.

Flynn, K. M., Delclos, K. B., Newbold, R. R., & Ferguson, S. A. (2001). Behavioral responses of rats exposed to long-term dietary vinclozolin. *J Agric Food Chem*, *49*(3), 1658-1665.

Flynn, K. M., Ferguson, S. A., Delclos, K. B., & Newbold, R. R. (2000). Effects of genistein exposure on sexually dimorphic behaviors in rats. *Toxicol Sci*, *55*(2), 311-319.

Folsvik, N., Berge, J. A., Brevik, E. M., & Walday, M. (1999). Quantification of organotin compounds and determination of imposex in populations of dogwhelks (*Nucella lapillus*) from Norway. *Chemosphere*, *38*(3), 681-691.

Ford, H., Johnson, L., Purdie, G., & Feek, C. (1997). Effects of hyperthyroidism and radioactive iodine given to ablate the thyroid on the composition of whole stimulated saliva. *Clin Endocrinol (Oxf)*, *46*(2), 189-193.

Franke, A. A., Custer, L. J., & Tanaka, Y. (1998). Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. *Am J Clin Nutr*, *68*(6 Suppl), 1466S-1473S.

Frassetto, F., Parisotto, T. M., Peres, R. C., Marques, M. R., Line, S. R., & Nobre Dos Santos, M. (2012). Relationship among salivary carbonic anhydrase VI activity and flow rate, biofilm pH and caries in primary dentition. *Caries Res*, *46*(3), 194-200.

Friedlander, A. H. (2002). The physiology, medical management and oral implications of menopause. *J Am Dent Assoc*, *133*(1), 73-81.

Froehlich, D. A., Pangborn, R. M., & Whitaker, J. R. (1987). The effect of oral stimulation on human parotid salivary flow rate and alpha-amylase secretion. *Physiol Behav*, *41*(3), 209-217.

Frye, C. A., Crystal, S., Ward, K. D., & Kanarek, R. B. (1994). Menstrual cycle and dietary restraint influence taste preferences in young women. *Physiol Behav*, 55(3), 561-567.

Fujitake, J., Komatsu, Y., Hataya, Y., Nishikawa, A., Eriguchi, M., Mizuta, H., & Hayashi, M. (2011). A case of Marinesco-Sjogren syndrome: MRI observations of skeletal muscles, bone metabolism, and treatment with testosterone and risedronate. *Intern Med*, 50(2), 145-149.

Fukushima, M., & Barka, T. (1976). The effects of 5-bromodeoxyuridine and isoproterenol on the postnatal differentiation of rat submandibular gland. *Am J Anat*, 147(2), 159-182.

Funegard, U., Franzen, L., Ericson, T., & Henriksson, R. (1994). Parotid saliva composition during and after irradiation of head and neck cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 30B(4), 230-233.

Furukawa, O., Matsui, H., Suzuki, N., & Okabe, S. (1999). Epidermal growth factor protects rat epithelial cells against acid-induced damage through the activation of Na⁺/H⁺ exchangers. *J Pharmacol Exp Ther*, 288(2), 620-626.

Galili, D., Maller, O., & Brightman, V. J. (1981). The effects of desalivation by duct ligation or salivary gland extirpation on taste preference in rats. *Arch Oral Biol*, 26(11), 853-858.

Garcia-Rodriguez, J., Garcia-Martin, M., Nogueras-Ocana, M., de Dios Luna-del-Castillo, J., Espigares Garcia, M., Olea, N., & Lardelli-Claret, P. (1996). Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. *Environ Health Perspect*, 104(10), 1090-1095.

Gilman, S., Thornton, R., Miller, D., & Biersner, R. (1979). Effects of exercise stress on parotid gland secretion. *Horm Metab Res*, 11(7), 454.

Giuca, M. R., Carli, E., Pasini, M., Bonfigli, D., & Cappe, M. R. (2009). Evaluation of efficacy of estrogen and phytotherapy in oral cavity alterations of women in menopause. *Minerva Ginecol*, 61(1), 13-22.

- Glasgow, B. J. (1995). Tissue expression of lipocalins in human lacrimal and von Ebner's glands: colocalization with lysozyme. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 233(8), 513-522.
- Gooding, M. P., Wilson, V. S., Folmar, L. C., Marcovich, D. T., & LeBlanc, G. A. (2003). The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Environ Health Perspect*, 111(4), 426-430.
- Gorr, S. U., & Abdolhosseini, M. (2011). Antimicrobial peptides and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 38 Suppl 11, 126-141.
- Grad, B., & Leblond, C. P. (1949). The necessity of testis and thyroid hormones for the maintenance of the serous tubules of the submaxillary gland in the male rat. *Endocrinology*, 45(3), 250-266.
- Gradolatto, A., Teyssier, C., Stroheker, T., Chagnon, M. C., & Canivenc-Lavier, M. C. (2002). Could apigenin metabolism explain the estrogenic effect of this flavonoid in the female immature rat? *IARC Sci Publ*, 156, 411-412.
- Gray, L. E., Jr., Ostby, J., Monosson, E., & Kelce, W. R. (1999). Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Ind Health*, 15(1-2), 48-64.
- Gray, L. E., Jr., Ostby, J. S., & Kelce, W. R. (1994). Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 129(1), 46-52.
- Greenwell, P. (1997). Blood group antigens: molecules seeking a function? *Glycoconj J*, 14(2), 159-173.
- Gresik, E. W. (1975). The postnatal development of the sexually dimorphic duct system and of amylase activity in the submandibular glands of mice. *Cell Tissue Res*, 157(3), 411-422.
- Gresik, E. W. (1980). Postnatal developmental changes in submandibular glands of rats and mice. *J Histochem Cytochem*, 28(8), 860-870.

- Gresik, E. W., Hosoi, K., Kurihara, K., Maruyama, S., & Ueha, T. (1996). The rodent granular convoluted tubule cell--an update. *Eur J Morphol*, 34(3), 221-224.
- Grisham, M. B., & Ryan, E. M. (1990). Cytotoxic properties of salivary oxidants. *Am J Physiol*, 258(1 Pt 1), C115-121.
- Grobstein, C. (1953). Inductive epitheliomesenchymal interaction in cultured organ rudiments of the mouse. *Science*, 118(3054), 52-55.
- Groschl, M., Topf, H. G., Bohlender, J., Zenk, J., Klussmann, S., Dotsch, J., Rascher, W., & Rauh, M. (2005). Identification of ghrelin in human saliva: production by the salivary glands and potential role in proliferation of oral keratinocytes. *Clin Chem*, 51(6), 997-1006.
- Gubits, R. M., Shaw, P. A., Gresik, E. W., Onetti-Muda, A., & Barka, T. (1986). Epidermal growth factor gene expression is regulated differently in mouse kidney and submandibular gland. *Endocrinology*, 119(3), 1382-1387.
- Guillemin, R. (2005). Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. *J Endocrinol*, 184(1), 11-28.
- Guillette, L. J., Jr., Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F., & Woodward, A. R. (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect*, 102(8), 680-688.
- Hammond, B., Katzenellenbogen, B. S., Krauthammer, N., & McConnell, J. (1979). Estrogenic activity of the insecticide chlordecone (Kepone) and interaction with uterine estrogen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(12), 6641-6645.
- Han, V. K., D'Ercole, A. J., & Lund, P. K. (1987). Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science*, 236(4798), 193-197.

Hanker, J. S., Carson, K. A., Yates, P. E., Preece, J. W., Doe, D. A., Ambrose, W. W., & Coffey, J. C., Jr. (1980). Cytochemical correlates of structural sexual dimorphism in glandular tissues of the mouse. *Histochemistry*, 68(2), 99-118.

Hansson, H. A., & Tunhall, S. (1988). Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I are localized in different compartments of salivary gland duct cells. Immunohistochemical evidence. *Acta Physiol Scand*, 134(3), 383-389.

Hany, J., Lilienthal, H., Sarasin, A., Roth-Harer, A., Fastabend, A., Dunemann, L., Lichtensteiger, W., & Winneke, G. (1999). Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: effects on organ weights, aromatase activity, sex hormone levels, and sweet preference behavior. *Toxicol Appl Pharmacol*, 158(3), 231-243.

Harris, G. W. (1964). Sex Hormones, Brain Development and Brain Function. *Endocrinology*, 75, 627-648.

Hartley, D. E., Edwards, J. E., Spiller, C. E., Alom, N., Tucci, S., Seth, P., Forsling, M. L., & File, S. E. (2003). The soya isoflavone content of rat diet can increase anxiety and stress hormone release in the male rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 167(1), 46-53.

Hauser-Kronberger, C., Albegger, K., Saria, A., & Hacker, G. W. (1992). Neuropeptides in human salivary (submandibular and parotid) glands. *Acta Otolaryngol*, 112(2), 343-348.

Hayashi, H., Ozono, S., Watanabe, K., Nagatsu, I., & Onozuka, M. (2000). Morphological aspects of the postnatal development of submandibular glands in male rats: involvement of apoptosis. *J Histochem Cytochem*, 48(5), 695-698.

Heintze, U., Birkhed, D., & Bjorn, H. (1983). Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed Dent J*, 7(6), 227-238.

Hemming, J. M., Waller, W. T., Chow, M. C., Denslow, N. D., & Venables, B. (2001). Assessment of the estrogenicity and toxicity of a domestic wastewater effluent flowing through a constructed wetland system using biomarkers in male fathead minnows (*Pimephales promelas rafinesque*, 1820). *Environ Toxicol Chem*, 20(10), 2268-2275.

Henkin, R. I., Martin, B. M., & Agarwal, R. P. (1999a). Decreased parotid saliva gustin/carbonic anhydrase VI secretion: an enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. *Am J Med Sci*, 318(6), 380-391.

Henkin, R. I., Martin, B. M., & Agarwal, R. P. (1999b). Efficacy of exogenous oral zinc in treatment of patients with carbonic anhydrase VI deficiency. *Am J Med Sci*, 318(6), 392-405.

Hennigar, R. A., Schulte, B. A., & Spicer, S. S. (1983). Immunolocalization of carbonic anhydrase isozymes in rat and mouse salivary and exorbital lacrimal glands. *Anat Rec*, 207(4), 605-614.

Hilakivi-Clarke, L., Onojafe, I., Raygada, M., Cho, E., Skaar, T., Russo, I., & Clarke, R. (1999). Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis. *Br J Cancer*, 80(11), 1682-1688.

Hiller-Sturmhofel, S., & Bartke, A. (1998). The endocrine system: an overview. *Alcohol Health Res World*, 22(3), 153-164.

Hiramatsu, M., Kashimata, M., Takayama, F., & Minami, N. (1994). Developmental changes in and hormonal modulation of epidermal growth factor concentration in the rat submandibular gland. *J Endocrinol*, 140(3), 357-363.

Hogan, B. L. (1999). Morphogenesis. *Cell*, 96(2), 225-233.

Holder, C. L., Churchwell, M. I., & Doerge, D. R. (1999). Quantification of soy isoflavones, genistein and daidzein, and conjugates in rat blood using LC/ES-MS. *J Agric Food Chem*, 47(9), 3764-3770.

Hotchkiss, A. K., Ostby, J. S., Vandenberg, J. G., & Gray, L. E., Jr. (2003). An environmental antiandrogen, vinclozolin, alters the organization of play behavior. *Physiol Behav*, 79(2), 151-156.

Iaremenko, M. S. (1969). [Pituitrine and vasopressine influence on Na secretion with parotid saliva in varied intensity of Na reabsorption in ducts]. *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova*, 55(7), 866-873.

Inaloz, H. S., Ketani, M. A., Inaloz, S. S., Yilmaz, F., & Ketani, S. (2000). The effects of sialoadenectomy & flutamide on skin development. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 27(3-4), 231-234.

Inukai, Y., Ikeda, R., & Aiyama, S. (2008). Effect of glucocorticoid on the differentiation and development of terminal tubules in the fetal rat submandibular gland. *Cells Tissues Organs*, 187(3), 233-242.

Isenman, L., Liebow, C., & Rothman, S. (1999). The endocrine secretion of mammalian digestive enzymes by exocrine glands. *Am J Physiol*, 276(2 Pt 1), E223-232.

Ishimi, Y., Arai, N., Wang, X., Wu, J., Umegaki, K., Miyaura, C., Takeda, A., & Ikegami, S. (2000). Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 274(3), 697-701.

Islander, U., Hasseus, B., Erlandsson, M. C., Jochems, C., Skrtic, S. M., Lindberg, M., Gustafsson, J. A., Ohlsson, C., & Carlsten, H. (2005). Estren promotes androgen phenotypes in primary lymphoid organs and submandibular glands. *BMC Immunol*, 6, 16.

Jacoby, F., & Leeson, C. R. (1959). The postnatal development of the rat submaxillary gland. *J Anat*, 93(2), 201-216.

Jayasinghe, N. R., Cope, G. H., & Jacob, S. (1990). Morphometric studies on the development and sexual dimorphism of the submandibular gland of the mouse. *J Anat*, 172, 115-127.

Jefferson, W. N., Doerge, D., Padilla-Banks, E., Woodling, K. A., Kissling, G. E., & Newbold, R. (2009). Oral exposure to genistin, the glycosylated form of genistein, during neonatal life adversely affects the female reproductive system. *Environ Health Perspect*, 117(12), 1883-1889.

Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E., & Newbold, R. R. (2005). Adverse effects on female development and reproduction in CD-1 mice following neonatal exposure to the phytoestrogen genistein at environmentally relevant doses. *Biol Reprod*, 73(4), 798-806.

Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E., & Newbold, R. R. (2006). Studies of the effects of neonatal exposure to genistein on the developing female reproductive system. *J AOAC Int*, 89(4), 1189-1196.

Jenzano, J. W., Hogan, S. L., & Lundblad, R. L. (1992). The influence of age, sex and race on salivary kallikrein levels in human mixed saliva. *Agents Actions*, 35(1-2), 29-33.

Johnson, D. A., & Kalu, D. N. (1988). Influence of thyroxine in the regulation of rat parotid salivary protein composition. *J Dent Res*, 67(5), 812-816.

Jones, D. E., Jr., Tran-Patterson, R., Cui, D. M., Davin, D., Estell, K. P., & Miller, D. M. (1995). Epidermal growth factor secreted from the salivary gland is necessary for liver regeneration. *Am J Physiol*, 268(5 Pt 1), G872-878.

Ju, Y. H., Allred, C. D., Allred, K. F., Karko, K. L., Doerge, D. R., & Helferich, W. G. (2001). Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. *J Nutr*, 131(11), 2957-2962.

Junqueira, L. C., Fajer, A., & et al. (1948). Biochemical and histochemical observations on the sexual dimorphism of mouse submaxillary glands. *Biol Bull*, 95(2), 243.

Kaldas, R. S., & Hughes, C. L., Jr. (1989). Reproductive and general metabolic effects of phytoestrogens in mammals. *Reprod Toxicol*, 3(2), 81-89.

Kaplan, J. M., Bednar, I., & Sodersten, P. (1992). Simultaneous display of sexual and ingestive behaviour by rats. *J Neuroendocrinol*, 4(4), 381-392.

Kasayama, S., Yoshimura, M., & Oka, T. (1989). The regulation by thyroid hormones and androgen of epidermal growth factor synthesis in the submandibular gland and its plasma concentrations in mice. *J Endocrinol*, 121(2), 269-275.

Kawai, T., & Fushiki, T. (2003). Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285(2), R447-454.

Kelce, W. R., Lambright, C. R., Gray, L. E., Jr., & Roberts, K. P. (1997). Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: in vivo confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol*, 142(1), 192-200.

Kelce, W. R., Monosson, E., Gamcsik, M. P., Laws, S. C., & Gray, L. E., Jr. (1994). Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol*, 126(2), 276-285.

Kerr, M., Lee, A., Wang, P. L., Purushotham, K. R., Chegini, N., Yamamoto, H., & Humphreys-Beher, M. G. (1995). Detection of insulin and insulin-like growth factors I and II in saliva and potential synthesis in the salivary glands of mice. Effects of type 1 diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*, 49(10), 1521-1531.

Kester, M. H., Bulduk, S., van Toor, H., Tibboel, D., Meinel, W., Glatt, H., Falany, C. N., Coughtrie, M. W., Schuur, A. G., Brouwer, A., & Visser, T. J. (2002). Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated metabolites of polyhalogenated aromatic hydrocarbons reveals alternative mechanism for estrogenic activity of endocrine disruptors. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(3), 1142-1150.

Kho, H. S., Lee, S. W., Chung, S. C., & Kim, Y. K. (1999). Oral manifestations and salivary flow rate, pH, and buffer capacity in patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 88(3), 316-319.

Kielbassa, A. M., Hinkelbein, W., Hellwig, E., & Meyer-Luckel, H. (2006). Radiation-related damage to dentition. *Lancet Oncol*, 7(4), 326-335.

Kivela, J., Parkkila, S., Metteri, J., Parkkila, A. K., Toivanen, A., & Rajaniemi, H. (1997). Salivary carbonic anhydrase VI concentration and its relation to basic characteristics of saliva in young men. *Acta Physiol Scand*, 161(2), 221-225.

Kivela, J., Parkkila, S., Parkkila, A. K., & Rajaniemi, H. (1999). A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. *Caries Res*, 33(3), 178-184.

Konttinen, Y. T., Porola, P., Konttinen, L., Laine, M., & Poduval, P. (2006). Immunohistopathology of Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev*, 6(1), 16-20.

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.

Kristensen, P., Irgens, L. M., Andersen, A., Bye, A. S., & Sundheim, L. (1997). Birth defects among offspring of Norwegian farmers, 1967-1991. *Epidemiology*, 8(5), 537-544.

Krol, W. J., Arsenault, T. L., Pylypiw, H. M., Jr., & Incorvia Mattina, M. J. (2000). Reduction of pesticide residues on produce by rinsing. *J Agric Food Chem*, 48(10), 4666-4670.

Kronman, J. H., & Chauncey, H. H. (1964). Hormonal Influence on Rat Submandibular-Gland Histochemistry. *J Dent Res*, 43, 520-527.

Kuiper, G. G., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., & Gustafsson, J. A. (1998). The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, 19(4), 253-286.

Kurachi, H., Morishige, K., Amemiya, K., Adachi, H., Hirota, K., Miyake, A., & Tanizawa, O. (1991). Importance of transforming growth factor alpha/epidermal growth factor receptor autocrine growth mechanism in an ovarian cancer cell line in vivo. *Cancer Res*, 51(21), 5956-5959.

Kurzer, M. S., & Xu, X. (1997). Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr*, 17, 353-381.

Kuttann, F., & Mauvais-Jarvis, P. (1975). Testosterone 5alpha-reduction in the skin of normal subjects and of patients with abnormal sex development. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 79(1), 164-176.

Labrie, F. (1991). Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol*, 78(3), C113-118.

Labrie, F., Belanger, A., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., Cusan, L., Gomez, J. L., & Candas, B. (1998). DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. *Steroids*, 63(5-6), 322-328.

Lacassagne, A. (1940). Dimorphisme sexuel de la glande sous maxillaire chez la souris. *C. R. Soc. Biol*, 133, 180-181.

Lagerlof, F., & Dawes, C. (1985). Effect of sucrose as a gustatory stimulus on the flow rates of parotid and whole saliva. *Caries Res*, 19(3), 206-211.

Laine, M., Blauer, M., Ylikomi, T., Tuohimaa, P., Aitasalo, K., Happonen, R. P., & Tenovuo, J. (1993). Immunohistochemical demonstration of androgen receptors in human salivary glands. *Arch Oral Biol*, 38(4), 299-302.

Laine, M. A. (2002). Effect of pregnancy on periodontal and dental health. *Acta Odontol Scand*, 60(5), 257-264.

Lamartiniere, C. A., Cotroneo, M. S., Fritz, W. A., Wang, J., Mentor-Marcel, R., & Elgavish, A. (2002). Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J Nutr*, 132(3), 552S-558S.

Lawson, K. A. (1972). The role of mesenchyme in the morphogenesis and functional differentiation of rat salivary epithelium. *J Embryol Exp Morphol*, 27(3), 497-513.

Lazarevic, B., Hammarstrom, C., Yang, J., Ramberg, H., Diep, L. M., Karlsen, S. J., Kucuk, O., Saatcioglu, F., Tasken, K. A., & Svindland, A. (2012). The effects of short-term genistein intervention on prostate biomarker expression in patients with localised prostate cancer before radical prostatectomy. *Br J Nutr*, 1-10.

Lee, D. C., Rose, T. M., Webb, N. R., & Todaro, G. J. (1985). Cloning and sequence analysis of a cDNA for rat transforming growth factor-alpha. *Nature*, 313(6002), 489-491.

- Leeson, C. R. (1967). Structure of salivary glands. In: A. P. Society, *Handbook of Physiology*, vol. Vol. II (pp. pp.463-495). Washington DC.
- Lehnert, S. A., & Akhurst, R. J. (1988). Embryonic expression pattern of TGF beta type-1 RNA suggests both paracrine and autocrine mechanisms of action. *Development*, *104*(2), 263-273.
- Lehraiki, A., Messiaen, S., Berges, R., Canivenc-Lavier, M. C., Auger, J., Habert, R., & Levacher, C. (2011). Antagonistic effects of gestational dietary exposure to low-dose vinclozolin and genistein on rat fetal germ cell development. *Reprod Toxicol*, *31*(4), 424-430.
- Leimola-Virtanen, R., Salo, T., Toikkanen, S., Pulkkinen, J., & Syrjanen, S. (2000). Expression of estrogen receptor (ER) in oral mucosa and salivary glands. *Maturitas*, *36*(2), 131-137.
- Lewis, J. E., Nickell, L. A., Thompson, L. U., Szalai, J. P., Kiss, A., & Hilditch, J. R. (2006). A randomized controlled trial of the effect of dietary soy and flaxseed muffins on quality of life and hot flashes during menopause. *Menopause*, *13*(4), 631-642.
- Lewis, R. W., Brooks, N., Milburn, G. M., Soames, A., Stone, S., Hall, M., & Ashby, J. (2003). The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat. *Toxicol Sci*, *71*(1), 74-83.
- Li, A. K., Schattenkerk, M. E., De Vries, J. E., Ford, W. D., & Malt, R. A. (1983). Growth and metabolic alterations after submandibular sialadenectomy in male mice. *Am J Physiol*, *244*(1), R41-44.
- Li, X. J., & Snyder, S. H. (1995). Molecular cloning of Ebnerin, a von Ebner's gland protein associated with taste buds. *J Biol Chem*, *270*(30), 17674-17679.
- Liney, K. E., Hagger, J. A., Tyler, C. R., Depledge, M. H., Galloway, T. S., & Jobling, S. (2006). Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works. *Environ Health Perspect*, *114 Suppl 1*, 81-89.

- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., & Wenzel, A. (2003). Endocrine disruptors in the environment. *Pure Appl Chem*, 75(5), 631–681.
- Liu, A., Flores, C., Kinkead, T., Carboni, A. A., Menon, M., & Seethalakshmi, L. (1994). Effects of sialoadenectomy and epidermal growth factor on testicular function of sexually mature male mice. *J Urol*, 152(2 Pt 1), 554-561.
- Liu, F. T. (1967a). Effect of estrogen, thyroxin, and their combination on dental caries and salivary glands in ovariectomized and intact female rats. *J Dent Res*, 46(3), 471-477.
- Liu, F. T. (1967b). Effect of estrone and estriol on salivary glands and dental caries in female rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 124(2), 591-595.
- Liu, F. T., Lin, H. S., & Zullo, T. G. (1969). Effect of graded doses of estradiol benzoate on dental caries and salivary glands in female rats. *J Dent Res*, 48(3), 485.
- Lohmeier, T. E. (2003). Neurohypophysial hormones. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285(4), R715-717.
- Lugaz, O., Pillias, A. M., Boireau-Ducept, N., & Faurion, A. (2005). Time-intensity evaluation of acid taste in subjects with saliva high flow and low flow rates for acids of various chemical properties. *Chem Senses*, 30(1), 89-103.
- Lund, P. K., Moats-Staats, B. M., Hynes, M. A., Simmons, J. G., Jansen, M., D'Ercole, A. J., & Van Wyk, J. J. (1986). Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II mRNAs in rat fetal and adult tissues. *J Biol Chem*, 261(31), 14539-14544.
- Lyon, M. F., Hendry, I., & Short, R. V. (1973). The submaxillary salivary glands as test organs for response to androgen in mice with testicular feminization. *J Endocrinol*, 58(3), 357-362.
- Mackie, D. A., & Pangborn, R. M. (1990). Mastication and its influence on human salivary flow and alpha-amylase secretion. *Physiol Behav*, 47(3), 593-595.

Maier, H., Geissler, M., Heidland, A., Schindler, J. G., & Wigand, M. E. (1979). [The influence of menstruation cycle on human parotid saliva composition (author's transl)]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)*, 58(9), 706-710.

Makela, S., Poutanen, M., Lehtimaki, J., Kostian, M. L., Santti, R., & Vihko, R. (1995).

Estrogen-specific 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.C. 1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208(1), 51-59.

Mandel, I. D. (1993). A contemporary view of salivary research. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4(3-4), 599-604.

Mandel, I. D., Thompson, R. H., Jr., & Ellison, S. A. (1965). Studies on the mucoproteins of human parotid saliva. *Arch Oral Biol*, 10(3), 499-507.

Mange, A., Desmetz, C., Berthes, M. L., Maudelonde, T., & Solassol, J. (2008). Specific increase of human kallikrein 4 mRNA and protein levels in breast cancer stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 375(1), 107-112.

Manni, L., Albanesi, M., Guaragna, M., Barbaro Paparo, S., & Aloe, L. (2010). Neurotrophins and acupuncture. *Auton Neurosci*, 157(1-2), 9-17.

Martin, O., Shialis, T., Lester, J., Scrimshaw, M., Boobis, A., & Voulvoulis, N. (2008). Testicular dysgenesis syndrome and the estrogen hypothesis: a quantitative meta-analysis. *Cien Saude Colet*, 13(5), 1601-1618.

Martin, S., & Pangborn, R. M. (1971). Human parotid secretion in response to ethyl alcohol. *J Dent Res*, 50(2), 485-490.

Maruyama, S., Hosoi, K., Ueha, T., Tajima, M., Sato, S., & Gresik, E. W. (1993). Effects of female hormones and 3,5,3'-triiodothyronine or dexamethasone on induction of epidermal growth factor and proteinases F, D, A, and P in the submandibular glands of hypophysectomized male mice. *Endocrinology*, 133(3), 1051-1060.

- Massague, J. (1983). Epidermal growth factor-like transforming growth factor. I. Isolation, chemical characterization, and potentiation by other transforming factors from feline sarcoma virus-transformed rat cells. *J Biol Chem*, 258(22), 13606-13613.
- Mastroiacovo, P., Spagnolo, A., Marni, E., Meazza, L., Bertollini, R., Segni, G., & Borgna-Pignatti, C. (1988). Birth defects in the Seveso area after TCDD contamination. *JAMA*, 259(11), 1668-1672.
- Mata, A. D., Marques, D., Rocha, S., Francisco, H., Santos, C., Mesquita, M. F., & Singh, J. (2004). Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem*, 261(1-2), 137-142.
- Mathey, J., Puel, C., Kati-Coulibaly, S., Bennetau-Pelissero, C., Davicco, M. J., Lebecque, P., Horcajada, M. N., & Coxam, V. (2004). Fructooligosaccharides maximize bone-sparing effects of soy isoflavone-enriched diet in the ovariectomized rat. *Calcif Tissue Int*, 75(2), 169-179.
- Mathison, R. (1995). The Submandibular Glands: a role in homeostasis and allostasis. *Biomedical Reviews*, 4, 61-69.
- Mathison, R., Davison, J. S., & Befus, A. D. (1994). Neuroendocrine regulation of inflammation and tissue repair by submandibular gland factors. *Immunol Today*, 15(11), 527-532.
- Matoso, A., Easley, S. E., Gnepp, D. R., & Mangray, S. (2009). Salivary gland acinar-like differentiation of the breast. *Histopathology*, 54(2), 262-263.
- Matsuo, R. (2000). Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11(2), 216-229.
- Matsuura, I., Saitoh, T., Ashina, M., Wako, Y., Iwata, H., Toyota, N., Ishizuka, Y., Namiki, M., Hoshino, N., & Tsuchitani, M. (2005). Evaluation of a two-generation reproduction toxicity study adding endpoints to detect endocrine disrupting activity using vinclozolin. *J Toxicol Sci*, 30 Spec No., 163-188.

- Mazur, W., & Adlercreutz, H. (1998). Naturally occurring oestrogens in food. *Pure and Applied Chemistry*, 70(9), 1759-1776.
- McEwen, B. S., & Alves, S. E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev*, 20(3), 279-307.
- McLachlan, J. A., Newbold, R. R., & Bullock, B. (1975). Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Science*, 190(4218), 991-992.
- McPhaul, M. J., & Young, M. (2001). Complexities of androgen action. *J Am Acad Dermatol*, 45(3 Suppl), S87-94.
- Meaney, M. J., & Stewart, J. (1981). Neonatal-androgens influence the social play of prepubescent rats. *Horm Behav*, 15(2), 197-213.
- Meaney, M. J., Stewart, J., Poulin, P., & McEwen, B. S. (1983). Sexual differentiation of social play in rat pups is mediated by the neonatal androgen-receptor system. *Neuroendocrinology*, 37(2), 85-90.
- Mehansho, H., & Carlson, D. M. (1983). Induction of protein and glycoprotein synthesis in rat submandibular glands by isoproterenol. *J Biol Chem*, 258(10), 6616-6620.
- Mehansho, H., Clements, S., Sheares, B. T., Smith, S., & Carlson, D. M. (1985). Induction of proline-rich glycoprotein synthesis in mouse salivary glands by isoproterenol and by tannins. *J Biol Chem*, 260(7), 4418-4423.
- Mehansho, H., Hagerman, A., Clements, S., Butler, L., Rogler, J., & Carlson, D. M. (1983). Modulation of proline-rich protein biosynthesis in rat parotid glands by sorghums with high tannin levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(13), 3948-3952.
- Messina, M., McCaskill-Stevens, W., & Lampe, J. W. (2006). Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *J Natl Cancer Inst*, 98(18), 1275-1284.

Meteyer, C. U., Loeffler, I. K., Fallon, J. F., Converse, K. A., Green, E., Helgen, J. C., Kersten, S., Levey, R., Eaton-Poole, L., & Burkhart, J. G. (2000). Hind limb malformations in free-living northern leopard frogs (*Rana pipiens*) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies. *Teratology*, *62*(3), 151-171.

Mitsui, R., Fujita-Yoshigaki, J., Narita, T., Matsuki-Fukushima, M., Satoh, K., Qi, B., Guo, M. Y., Katsumata-Kato, O., & Sugiya, H. (2010). Maintenance of paracellular barrier function by insulin-like growth factor-I in submandibular gland cells. *Arch Oral Biol*, *55*(12), 963-969.

Mogi, M., Inagaki, H., Kojima, K., Minami, M., & Harada, M. (1995a). Transforming growth factor-alpha in human submandibular gland and saliva. *J Immunoassay*, *16*(4), 379-394.

Mogi, M., Matsuura, S., Suzuki, K., Inagaki, H., Minami, M., Kojima, K., & Harada, M. (1995b). Differential expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor during postnatal development of rat submandibular gland. *Biochem Biophys Res Commun*, *217*(1), 271-277.

Mole, S., Butler, L. G., & Iason, G. (1990). Defense against dietary tannin in herbivores: A survey for proline-rich salivary proteins in mammals. *Biochem. Syst. Ecol*, *18*, 287-293.

Molina-Molina, J. M., Hillenweck, A., Jouanin, I., Zalko, D., Cravedi, J. P., Fernandez, M. F., Pillon, A., Nicolas, J. C., Olea, N., & Balaguer, P. (2006). Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol*, *216*(1), 44-54.

Monosson, E., Kelce, W. R., Lambright, C., Ostby, J., & Gray, L. E., Jr. (1999). Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues, and alters androgen receptor function in the male rat. *Toxicol Ind Health*, *15*(1-2), 65-79.

Moore, K. L., & Dalley, A. F. (1999). *Clinically Orientated Anatomy*. (pp. pp.1010-1012). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

- Moore, P. A., Guggenheimer, J., Etzel, K. R., Weyant, R. J., & Orchard, T. (2001). Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 92(3), 281-291.
- Moreau, T., Brillard-Bourdet, M., Bouhnik, J., & Gauthier, F. (1992). Protein products of the rat kallikrein gene family. Substrate specificities of kallikrein rK2 (tonin) and kallikrein rK9. *J Biol Chem*, 267(14), 10045-10051.
- Moreira, J. E., Ball, W. D., Mirels, L., & Hand, A. R. (1991). Accumulation and localization of two adult acinar cell secretory proteins during development of the rat submandibular gland. *Am J Anat*, 191(2), 167-184.
- Moret, S., Coudert, J. L., Bejat, C., Robin, O., & Lissac, M. (1993). The influence of basal anxiety on unstimulated parotid and submandibular saliva. *Arch Oral Biol*, 38(9), 751-754.
- Mori, M., Takai, Y., & Kunikata, M. (1992). Biologically active peptides in submandibular gland—role of the granular convoluted tubule. *Acta Histochem Cytochem*, 25, 325–341.
- Morris-Wiman, J., Sego, R., Brinkley, L., & Dolce, C. (2000). The effects of sialoadenectomy and exogenous EGF on taste bud morphology and maintenance. *Chem Senses*, 25(1), 9-19.
- Mott, A. E., & Leopold, D. A. (1991). Disorders in taste and smell. *Med Clin North Am*, 75(6), 1321-1353.
- Mudd, B. D., & White, S. C. (1975). Sexual dimorphism in the rat submandibular gland. *J Dent Res*, 54(1), 193.
- Mueller, S. O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M., & Korach, K. S. (2004). Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicol Sci*, 80(1), 14-25.
- Mullangi, R., Agrawal, S., & Srinivas, N. R. (2009). Measurement of xenobiotics in saliva: is saliva an attractive alternative matrix? Case studies and analytical perspectives. *Biomed Chromatogr*, 23(1), 3-25.

- Murakami, H., & Sly, W. S. (1987). Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. *J Biol Chem*, 262(3), 1382-1388.
- Murray, T. J., Maffini, M. V., Ucci, A. A., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2007). Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol*, 23(3), 383-390.
- Nagler, R. M., & Hershkovich, O. (2005). Age-related changes in unstimulated salivary function and composition and its relations to medications and oral sensorial complaints. *Aging Clin Exp Res*, 17(5), 358-366.
- Nagler, R. M., Klein, I., Zarzhevsky, N., Drigues, N., & Reznick, A. Z. (2002). Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med*, 32(3), 268-277.
- Nanda, R., & Catalanotto, F. A. (1981). Long-term effects of surgical desalivation upon taste acuity, fluid intake, and taste buds in the rat. *J Dent Res*, 60(1), 69-76.
- Nashida, T., Sato, R., Imai, A., & Shimomura, H. (2010). Gene expression profiles of the three major salivary glands in rats *Biomed Res*, 31(6), 387-399.
- Navazesh, M., Mulligan, R. A., Kipnis, V., Denny, P. A., & Denny, P. C. (1992). Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentrations in healthy Caucasian young and aged adults. *J Dent Res*, 71(6), 1275-1278.
- Nellemann, C., Dalgaard, M., Lam, H. R., & Vinggaard, A. M. (2003). The combined effects of vinclozolin and procymidone do not deviate from expected additivity in vitro and in vivo. *Toxicol Sci*, 71(2), 251-262.
- Newbold, R. R., Padilla-Banks, E., & Jefferson, W. N. (2006). Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology*, 147(6 Suppl), S11-17.

Nielsen, P. A., Mandel, U., Therkildsen, M. H., & Clausen, H. (1996). Differential expression of human high-molecular-weight salivary mucin (MG1) and low-molecular-weight salivary mucin (MG2). *J Dent Res*, 75(11), 1820-1826.

Nikaido, Y., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Yuri, T., Uehara, N., & Tsubura, A. (2005). Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of estrogen target organs in female CD-1 mice. *In Vivo*, 19(3), 487-494.

Nilsson, E. E., Anway, M. D., Stanfield, J., & Skinner, M. K. (2008). Transgenerational epigenetic effects of the endocrine disruptor vinclozolin on pregnancies and female adult onset disease. *Reproduction*, 135(5), 713-721.

Nilsson, U., & Papantoni, M. (1996). Long-term studies of fungicide concentrations in greenhouses .3. Exposure risks after spraying in greenhouses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2885-2888.

Noguchi, S., Ohba, Y., & Oka, T. (1990). Involvement of epidermal growth factor deficiency in pathogenesis of oligozoospermia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Endocrinology*, 127(5), 2136-2140.

Noguchi, S., Ohba, Y., & Oka, T. (1991). Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Endocrinol*, 128(3), 425-431.

Norris, M. B., Noble, A. C., & Pangborn, R. M. (1984). Human saliva and taste responses to acids varying in anions, titratable acidity, and pH. *Physiol Behav*, 32(2), 237-244.

O'Shea, P. J., & Williams, G. R. (2002). Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *J Endocrinol*, 175(3), 553-570.

Ogata, T. (1955). The internal secretion of salivary gland. *Endocrinol Jpn*, 2(4), 247-261.

Okamoto, S., & Oka, T. (1984). Evidence for physiological function of epidermal growth factor: pregestational sialoadenectomy of mice decreases milk production and increases offspring mortality during lactation period. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(19), 6059-6063.

- Okamoto, T., Myoken, Y., Yabumoto, M., Osaki, T., Fujita, Y., Whitney, R. G., Kan, M., Crabb, J. W., Sato, G. H., Kato, Y., Takada, K., & Sato, J. D. (1996). Androgen-dependent expression of fibroblast growth factor-1 in submaxillary gland of mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, 221(3), 795-802.
- Orstavik, T. B. (1978). The distribution and secretion of kallikrein in some exocrine organs of the rat. *Acta Physiol Scand*, 104(4), 431-442.
- Orstavik, T. B., Brandtzaeg, P., Nustad, K., & Pierce, J. V. (1980). Immunohistochemical localization of kallikrein in human pancreas and salivary glands. *J Histochem Cytochem*, 28(6), 557-562.
- Orstavik, T. B., Gautvik, K. M., & Nustad, K. (1980). Intraglandular transport of 125I-glandular kallikrein in the rat submandibular salivary gland. *Acta Physiol Scand*, 109(3), 315-323.
- Orstavik, T. B., Nustad, K., & Brandtzaeg, P. (1979). Origin of kallikrein in rat and human exocrine glands and kidney. *Clin Sci (Lond)*, 57 Suppl 5, 239s-241s.
- Ostuni, M. A., Houssay, A. B., & Tumilasci, O. R. (2003). Modulation by thyroid hormones of rat parotid amylase secretion stimulated by 5-hydroxytryptamine. *Eur J Oral Sci*, 111(6), 492-496.
- Ozono, S., Onozuka, M., Sato, K., & Ito, Y. (1991). Immunohistochemical evidence for the presence of progesterone receptor in rat submandibular glands. *Cell Struct Funct*, 16(6), 511-513.
- Pannunzio, E., Amancio, O. M., Vitalle, M. S., Souza, D. N., Mendes, F. M., & Nicolau, J. (2010). Analysis of the stimulated whole saliva in overweight and obese school children. *Rev Assoc Med Bras*, 56(1), 32-36.

- Parkkila, S., Kaunisto, K., Rajaniemi, L., Kumpulainen, T., Jokinen, K., & Rajaniemi, H. (1990). Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands. *J Histochem Cytochem*, *38*(7), 941-947.
- Patisaul, H. B., Dindo, M., Whitten, P. L., & Young, L. J. (2001). Soy isoflavone supplements antagonize reproductive behavior and estrogen receptor alpha- and beta-dependent gene expression in the brain. *Endocrinology*, *142*(7), 2946-2952.
- Patisaul, H. B., Melby, M., Whitten, P. L., & Young, L. J. (2002). Genistein affects ER beta- but not ER alpha-dependent gene expression in the hypothalamus. *Endocrinology*, *143*(6), 2189-2197.
- Pedersen, A. M., Bardow, A., Jensen, S. B., & Nauntofte, B. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis*, *8*(3), 117-129.
- Penschow, J. D., & Coghlan, J. P. (1993). Secretion of glandular kallikrein and renin from the basolateral pole of mouse submandibular duct cells: an immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem*, *41*(1), 95-103.
- Percival, R. S., Challacombe, S. J., & Marsh, P. D. (1994). Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. *J Dent Res*, *73*(8), 1416-1420.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, *29*(9), e45.
- Pfaffl, M. W., Lange, I. G., Daxenberger, A., & Meyer, H. H. (2001). Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR. *APMIS*, *109*(5), 345-355.
- Pihlajamaa, P., Zhang, F. P., Saarinen, L., Mikkonen, L., Hautaniemi, S., & Janne, O. A. (2011). The phytoestrogen genistein is a tissue-specific androgen receptor modulator. *Endocrinology*, *152*(11), 4395-4405.

- Pike, A. C., Brzozowski, A. M., Hubbard, R. E., Bonn, T., Thorsell, A. G., Engstrom, O., Ljunggren, J., Gustafsson, J. A., & Carlquist, M. (1999). Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J*, 18(17), 4608-4618.
- Pinkstaff, C. A. (1980). The cytology of salivary glands. *Int Rev Cytol*, 63, 141-261.
- Pinkstaff, C. A. (1998). Salivary gland sexual dimorphism: a brief review. *Eur J Morphol*, 36 Suppl, 31-34.
- Price, K. R., & Fenwick, G. R. (1985). Naturally occurring oestrogens in foods--a review. *Food Addit Contam*, 2(2), 73-106.
- Proctor, G. B., & Carpenter, G. H. (2007). Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci*, 133(1), 3-18.
- Prosser, C. G., & Hartmann, P. E. (1983). Saliva and breast milk composition during the menstrual cycle of women. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 61 (Pt 3), 265-275.
- Prutkin, J., Fisher, E. M., Etter, L., Fast, K., Gardner, E., Lucchina, L. A., Snyder, D. J., Tie, K., Weiffenbach, J., & Bartoshuk, L. M. (2000). Genetic variation and inferences about perceived taste intensity in mice and men. *Physiol Behav*, 69(1-2), 161-173.
- Raisz, L. G., & Bingham, P. J. (1972). Effect of hormones on bone development. *Annu Rev Pharmacol*, 12, 337-352.
- Rebustini, I. T., & Hoffman, M. P. (2009). ECM and FGF-dependent assay of embryonic SMG epithelial morphogenesis: investigating growth factor/matrix regulation of gene expression during submandibular gland development. *Methods Mol Biol*, 522, 319-330.
- Redman, R. S., & Sreebny, L. M. (1970). The prenatal phase of the morphosis of the rat parotid gland. *Anat Rec*, 168(2), 127-137.

- Reiter, R. J., Tan, D. X., & Fuentes-Broto, L. (2010). Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res*, *181*, 127-151.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Mayo, J. C., & Sainz, R. M. (2009). Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod*, *81*(3), 445-456.
- Renegar, K. B., Kudsk, K. A., Dewitt, R. C., Wu, Y., & King, B. K. (2001). Impairment of mucosal immunity by parenteral nutrition: depressed nasotracheal influenza-specific secretory IgA levels and transport in parenterally fed mice. *Ann Surg*, *233*(1), 134-138.
- Reyes, A. B., & Wakasugi, N. (1995). Long-term influence of sialoadenectomy on reproductive performance of male mice. *J Reprod Fertil*, *105*(2), 279-285.
- Rins de David, M. L., Caceres, A., & Goldraij, A. (1990). [Sexual dimorphism in rat submaxillary gland]. *Acta Odontol Latinoam*, *5*(1), 63-69.
- Rohleder, N., Nater, U. M., Wolf, J. M., Ehlert, U., & Kirschbaum, C. (2004). Psychosocial stress-induced activation of salivary alpha-amylase: an indicator of sympathetic activity? *Ann NY Acad Sci*, *1032*, 258-263.
- Romero, P. R., Beltramino, C. A., & Carrer, H. F. (1990). Participation of the olfactory system in the control of approach behavior of the female rat to the male. *Physiol Behav*, *47*(4), 685-690.
- Rosai, J. (1996). Pleomorphic adenoma of the salivary gland and breast. In: *Rosai J editors. Ackerman's Surgical Pathology. St Louis: Mosby-Year Book Inc.*
- Rosol, T. J., Yarrington, J. T., Latendresse, J., & Capen, C. C. (2001). Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicol Pathol*, *29*(1), 41-48.
- Rougeot, C., Rosinski-Chupin, I., Mathison, R., & Rougeon, F. (2000). Rodent submandibular gland peptide hormones and other biologically active peptides. *Peptides*, *21*(3), 443-455.

- Russell, L. D., Weiss, T., Goh, J. C., & Curl, J. L. (1990). The effect of submandibular gland removal on testicular and epididymal parameters. *Tissue Cell*, 22(3), 263-268.
- Sabbadini, E., & Berczi, I. (1995). The submandibular gland: a key organ in the neuro-immuno-regulatory network? *Neuroimmunomodulation*, 2(4), 184-202.
- Safe, S., & Krishnan, V. (1995). Cellular and molecular biology of aryl hydrocarbon (Ah) receptor-mediated gene expression. *Arch Toxicol Suppl*, 17, 99-115.
- Sakai, T., & Onodera, T. (2008). Embryonic organ culture. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 19, Unit 19 18.
- Sakamoto, S., Ichikawa, S., Komabayashi, T., & Tsuboi, M. (1981). [Effects of adrenaline, noradrenaline and pilocarpine on the oxygen uptake in rat submandibular gland (author's transl)]. *Nihon Seirigaku Zasshi*, 43(10), 469-478.
- Salvolini, E., Di Giorgio, R., Curatola, A., Mazzanti, L., & Fratto, G. (1998). Biochemical modifications of human whole saliva induced by pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, 105(6), 656-660.
- Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. W., & van den Berg, M. (2002). Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 182(1), 44-54.
- Sarosiek, J., Bilski, J., Murty, V. L., Slomiany, A., & Slomiany, B. L. (1988). Role of salivary epidermal growth factor in the maintenance of physicochemical characteristics of oral and gastric mucosal mucus coat. *Biochem Biophys Res Commun*, 152(3), 1421-1427.
- Saruta, J., Sato, S., & Tsukinoki, K. (2010). The role of neurotrophins related to stress in saliva and salivary glands. *Histol Histopathol*, 25(10), 1317-1330.
- Sashima, M. (1986). Age-related changes of rat submandibular gland: a morphometric and ultrastructural study. *J Oral Pathol*, 15(10), 507-512.

- Sawada, K., & Noumura, T. (1991). Effects of castration and sex steroids on sexually dimorphic development of the mouse submandibular gland. *Acta Anat (Basel)*, *140*(2), 97-103.
- Scannapieco, F. A., Torres, G., & Levine, M. J. (1993). Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation. *Crit Rev Oral Biol Med*, *4*(3-4), 301-307.
- Schick, B., Moza, P. N., Hustert, K., & Kettrup, A. (1999). Photochemistry of vinclozolin in water and methanol-water solution. *Pestic. Sci*, *55*, 1116-1122.
- Schoff, P. K., Johnson, C. M., Schotthoefer, A. M., Murphy, J. E., Lieske, C., Cole, R. A., Johnson, L. B., & Beasley, V. R. (2003). Prevalence of skeletal and eye malformations in frogs from north-central United States: estimations based on collections from randomly selected sites. *J Wildl Dis*, *39*(3), 510-521.
- Schulz, B. L., Cooper-White, J., & Punyadeera, C. K. (2012). Saliva proteome research: current status and future outlook. *Crit Rev Biotechnol*.
- Scott, J. (1977a). A morphometric study of age changes in the histology of the ducts of human submandibular salivary glands. *Arch Oral Biol*, *22*(4), 243-249.
- Scott, J. (1977b). Quantitative age changes in the histological structure of human submandibular salivary glands. *Arch Oral Biol*, *22*(3), 221-227.
- Scott, J., Woods, K., & Baxter, P. (1988). Salivary flow rate, protein and electrolyte concentrations in chronic alcoholic patients. *J Biol Buccale*, *16*(4), 215-218.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W. T., Wolfe, B. E., Kirschner, A. S., & Heubi, J. E. (2002). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr*, *76*(2), 447-453.

Setchell, K. D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., & Heubi, J. E. (1998). Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr*, 68(6 Suppl), 1453S-1461S.

Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., & Barnes, S. (1997). Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J Nutr*, 127(7), 1260-1268.

Shackelford, J. M., & Klapper, E. C. (1962). Structure and carbohydrate histochemistry of mammalian salivary glands. *Am J Anat*, 111, 25-47.

Shafer, W. G., & Muhler, J. C. (1953). Effect of gonadectomy and sex hormones on the structure of the rat salivary glands. *J Dent Res*, 32(2), 262-268.

Shatzman, A. R., & Henkin, R. I. (1981). Gustin concentration changes relative to salivary zinc and taste in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(6), 3867-3871.

Sheffield, L. G., & Welsch, C. W. (1987). Influence of submandibular salivary glands on hormone responsiveness of mouse mammary glands. *Proc Soc Exp Biol Med*, 186(3), 368-377.

Sherwin, B. B. (1994). Estrogenic effects on memory in women. *Ann N Y Acad Sci*, 743, 213-230; discussion 230-211.

Shick, P. C., Riordan, G. P., & Foss, R. D. (1995). Estrogen and progesterone receptors in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 80(4), 440-444.

Ship, J. A., & Fischer, D. J. (1997). The relationship between dehydration and parotid salivary gland function in young and older healthy adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 52(5), M310-319.

Sierra-Santoyo, A., Barton, H. A., & Hughes, M. F. (2004). Liquid chromatography determination of the anti-androgen vinclozolin and its metabolites in rat serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 809(1), 105-110.

Silva, E., Rajapakse, N., & Kortenkamp, A. (2002). Something from "nothing"--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol*, 36(8), 1751-1756.

Simmer, J. P., Richardson, A. S., Smith, C. E., Hu, Y., & Hu, J. C. (2011). Expression of kallikrein-related peptidase 4 in dental and non-dental tissues. *Eur J Oral Sci*, 119 Suppl 1, 226-233.

Simson, J. A., Chao, J., & Chao, L. (1992). Localization of kallikrein gene family proteases in rat tissues. *Agents Actions Suppl*, 38 (Pt 1), 595-602.

Skinner, M. K., Anway, M. D., Savenkova, M. I., Gore, A. C., & Crews, D. (2008). Transgenerational epigenetic programming of the brain transcriptome and anxiety behavior. *PLoS One*, 3(11), e3745.

Skosnik, P. D., Chatterton, R. T., Jr., Swisher, T., & Park, S. (2000). Modulation of attentional inhibition by norepinephrine and cortisol after psychological stress. *Int J Psychophysiol*, 36(1), 59-68.

Slikker, W., Jr., Scallet, A. C., Doerge, D. R., & Ferguson, S. A. (2001). Gender-based differences in rats after chronic dietary exposure to genistein. *Int J Toxicol*, 20(3), 175-179.

Sly, W. S., & Hu, P. Y. (1995). Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem*, 64, 375-401.

Song, T. T., Hendrich, S., & Murphy, P. A. (1999). Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. *J Agric Food Chem*, 47(4), 1607-1610.

Speirs, R. L. (1971). The effects of interactions between gustatory stimulation the reflex flow-rate of human parotid saliva. *Arch Oral Biol*, 16(4), 349-365.

Spielman, A. I. (1990). Interaction of saliva and taste. *J Dent Res*, 69(3), 838-843.

Spielman, A. I. (1998). Chemosensory function and dysfunction. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9(3), 267-291.

Srivastava, H. C. (1977). Development of acinar cells in the rat submandibular gland. *J Anat*, 123(Pt 2), 459-465.

Steiner, C., Arnould, S., Scalbert, A., & Manach, C. (2008). Isoflavones and the prevention of breast and prostate cancer: new perspectives opened by nutrigenomics. *Br J Nutr*, 99 E Suppl 1, ES78-108.

Steinfeld, S., Maho, A., Chaboteaux, C., Daelemans, P., Pochet, R., Appelboom, T., & Kiss, R. (2000). Prolactin up-regulates cathepsin B and D expression in minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Lab Invest*, 80(11), 1711-1720.

Streckfus, C. F., Baur, U., Brown, L. J., Bacal, C., Metter, J., & Nick, T. (1998). Effects of estrogen status and aging on salivary flow rates in healthy Caucasian women. *Gerontology*, 44(1), 32-39.

Stroheker, T., Chagnon, M. C., Pinnert, M. F., Berges, R., & Canivenc-Lavier, M. C. (2003). Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reprod Toxicol*, 17(4), 421-432.

Suzuki, Y., Mizoguchi, I., & Uchida, N. (2007). Detection of neurotrophic factors in taste buds by laser capture microdissection, immunohistochemistry, and in situ hybridization. *Arch Histol Cytol*, 70(2), 117-126.

Swan, S. H., Elkin, E. P., & Fenster, L. (1997). Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect*, 105(11), 1228-1232.

Szeto, S. Y., Burlinson, N. E., Rahe, J. E., & Oloffs, P. C. (1989). Kinetics of Hydrolysis of the Dicarboximide Fungicide Vinclozolin. *J Agric Food Chem*, 37, 523-529.

Tabak, L. A. (1995). In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol*, 57, 547-564.

Tanaka, M. (2002). Secretory function of the salivary gland in patients with taste disorders or xerostomia: correlation with zinc deficiency. *Acta Otolaryngol Suppl*(546), 134-141.

Tanneau, R., Pennec, Y. L., Jouquan, J., Youinou, P., & Le Menn, G. (1989). Primary Sjogren's syndrome (SS) with inappropriate antidiuretic hormone secretion (SIADH). *Clin Exp Rheumatol*, 7(5), 570-572.

Tarakji, B., & Kujan, O. (2012). Expression of oestrogen progesterone and androgen receptors in salivary gland tumours. A review of literature. *Gulf J Oncolog*, 1(11), 50-59.

Tarttelin, M. F., & Gorski, R. A. (1971). Variations in food and water intake in the normal and acyclic female rat. *Physiol Behav*, 7(6), 847-852.

Thatcher, B. J., Doherty, A. E., Orvisky, E., Martin, B. M., & Henkin, R. I. (1998). Gustin from human parotid saliva is carbonic anhydrase VI. *Biochem Biophys Res Commun*, 250(3), 635-641.

Thaysen, J. H., Thorn, N. A., & Schwartz, I. L. (1954). Excretion of sodium, potassium, chloride and carbon dioxide in human parotid saliva. *Am J Physiol*, 178(1), 155-159.

Timchalk, C., Campbell, J. A., Liu, G., Lin, Y., & Kousba, A. A. (2007). Development of a non-invasive biomonitoring approach to determine exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos in rat saliva. *Toxicol Appl Pharmacol*, 219(2-3), 217-225.

Todaro, G. J., Fryling, C., & De Larco, J. E. (1980). Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(9), 5258-5262.

Treister, N. S., Richards, S. M., Suzuki, T., Jensen, R. V., & Sullivan, D. A. (2005). Influence of androgens on gene expression in the BALB/c mouse submandibular gland. *J Dent Res*, 84(12), 1187-1192.

Tsutsumi, O., Kurachi, H., & Oka, T. (1986). A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science*, 233(4767), 975-977.

Tsutsumi, O., Taketani, Y., & Oka, T. (1993). The uterine growth-promoting action of epidermal growth factor and its function in the fertility of mice. *J Endocrinol*, 138(3), 437-444.

Tucker, A. S. (2007). Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol*, 18(2), 237-244.

Tuomela, T., Miettinen, P., Pesonen, K., Viinikka, L., & Perheentupa, J. (1990). Epidermal growth factor in mice: effects of estradiol, testosterone and dexamethasone. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 123(2), 211-217.

Valdez, I. H., & Fox, P. C. (1991). Interactions of the salivary and gastrointestinal systems. I. The role of saliva in digestion. *Dig Dis*, 9(3), 125-132.

Valimaa, H., Savolainen, S., Soukka, T., Silvoniemi, P., Makela, S., Kujari, H., Gustafsson, J. A., & Laine, M. (2004). Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands. *J Endocrinol*, 180(1), 55-62.

Valov, S. D. (1995). [The morphofunctional characteristics of the epithelium of the salivary glands and the neuroendocrine regulation of its histogenesis]. *Morfologija*, 108(2), 52-53.

Van Der Kraak, G., & Lister, A. L. (2011). The inhibitory control of oocyte maturation in the zebrafish (*Danio rerio*): the role of the G protein-coupled estrogen receptor and epidermal growth factor. *Biol Reprod*, 85(1), 6-8.

van der Reijden, W. A., Veerman, E. C., & Amerongen, A. V. (1993). Shear rate dependent viscoelastic behavior of human glandular salivas. *Biorheology*, 30(2), 141-152.

Vidailhet, B., Robin, O., Polo, A., Bravetti, P., & Mahler, P. (2000). Salivation. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Stomatologie/Odontologie(22-008-A-05)*, 7p.

Viladrich, M., Sanchez, O., Soley, M., & Ramirez, I. (2008). Alterations in liver parenchyma after sialoadenectomy in mice: contribution of neutrophils and macrophages to the removal of damaged hepatocytes. *Histol Histopathol*, 23(11), 1341-1352.

Vilela, M. L., Willingham, E., Buckley, J., Liu, B. C., Agras, K., Shiroyanagi, Y., & Baskin, L. S. (2007). Endocrine disruptors and hypospadias: role of genistein and the fungicide vinclozolin. *Urology*, *70*(3), 618-621.

Vinggaard, A. M., Christiansen, S., Laier, P., Poulsen, M. E., Breinholt, V., Jarfelt, K., Jacobsen, H., Dalgaard, M., Nellemann, C., & Hass, U. (2005). Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the male rat offspring. *Toxicol Sci*, *85*(2), 886-897.

Viswanath, G., Chatterjee, S., Dabral, S., Nanguneri, S. R., Divya, G., & Roy, P. (2010). Anti-androgenic endocrine disrupting activities of chlorpyrifos and piperophos. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *120*(1), 22-29.

Waller, C. L., Oprea, T. I., Chae, K., Park, H. K., Korach, K. S., Laws, S. C., Wiese, T. E., Kelce, W. R., & Gray, L. E., Jr. (1996). Ligand-based identification of environmental estrogens. *Chem Res Toxicol*, *9*(8), 1240-1248.

Walsh, N. P., Blannin, A. K., Clark, A. M., Cook, L., Robson, P. J., & Gleeson, M. (1999). The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and alpha-amylase. *J Sports Sci*, *17*(2), 129-134.

Walz, A., Stuhler, K., Wattenberg, A., Hawranke, E., Meyer, H. E., Schmalz, G., Bluggel, M., & Ruhl, S. (2006). Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, *6*(5), 1631-1639.

Wang, C., & Kurzer, M. S. (1997). Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutr Cancer*, *28*(3), 236-247.

Whitehead, S. A., & Rice, S. (2006). Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, *20*(1), 45-61.

Wikner, S., & Soder, P. O. (1994). Factors associated with salivary buffering capacity in young adults in Stockholm, Sweden. *Scand J Dent Res*, *102*(1), 50-53.

Will, F., & Kruger, E. (1999). Fungicide residues in strawberry processing. *J Agric Food Chem*, 47(3), 858-861.

Wilson, J. D., & Goldstein, J. L. (1972). Evidence for increased cytoplasmic androgen binding in the submandibular gland of the mouse with testicular feminization. *J Biol Chem*, 247(22), 7342-7348.

Winter, J. S., Faiman, C., & Reyes, F. I. (1977). Sex steroid production by the human fetus: its role in morphogenesis and control by gonadotropins. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 13(2), 41-58.

Wiseman, H., Casey, K., Clarke, D. B., Barnes, K. A., & Bowey, E. (2002). Isoflavone aglycon and glucoconjugate content of high- and low-soy U.K. foods used in nutritional studies. *J Agric Food Chem*, 50(6), 1404-1410.

Wolf, C. J., LeBlanc, G. A., Ostby, J. S., & Gray, L. E., Jr. (2000). Characterization of the period of sensitivity of fetal male sexual development to vinclozolin. *Toxicol Sci*, 55(1), 152-161.

Wong, C. K., & Keung, W. M. (1999). Bovine adrenal 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (E.C. 1.1.1. 145)/5-ene-4-ene isomerase (E.C. 5.3.3.1): characterization and its inhibition by isoflavones. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 71(5-6), 191-202.

Wu, H. H., Kawamata, H., Wang, D. D., & Oyasu, R. (1993). Immunohistochemical localization of transforming growth factor alpha in the major salivary glands of male and female rats. *Histochem J*, 25(9), 613-618.

Xu, X., Tan, L., Himi, T., Sadamatsu, M., Tsutsumi, S., Akaike, M., & Kato, N. (2011). Changed preference for sweet taste in adulthood induced by perinatal exposure to bisphenol A-A probable link to overweight and obesity. *Neurotoxicol Teratol*, 33(4), 458-463.

Yamashina, S., & Barka, T. (1974). Peroxidase activity in the developing rat submandibular gland. *Lab Invest*, 31(1), 82-89.

Yang, S. H., Morgan, A. A., Nguyen, H. P., Moore, H., Figard, B. J., & Schug, K. A. (2011). Quantitative determination of bisphenol A from human saliva using bulk derivatization and trap-and-elute liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Environ Toxicol Chem*, 30(6), 1243-1251.

Yao, B., Fan, J., Wang, Y. M., Cui, Y. X., & Huang, Y. F. (2002). [The distribution of androgen receptor and its coexistence with gonadotropin releasing hormone receptor in rat submaxillary]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 8(1), 32-34.

Yashida, M. H., Da Silva Faria, A. L., & Caldeira, E. J. (2011). Estrogen and insulin replacement therapy modulates the expression of insulin-like growth factor-I receptors in the salivary glands of diabetic mice. *Anat Rec (Hoboken)*, 294(11), 1930-1938.

Young, J. A., & Van Lennep, E. W. (1978). The morphology of salivary glands *London ; New York : Academic Press*, 177-231.

Younglai, E. V., Holloway, A. C., Lim, G. E., & Foster, W. G. (2004). Synergistic effects between FSH and 1,1-dichloro-2,2-bis(P-chlorophenyl)ethylene (P,P'-DDE) on human granulosa cell aromatase activity. *Hum Reprod*, 19(5), 1089-1093.

Yousef, G. M., & Diamandis, E. P. (2002). Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway? *Biol Chem*, 383(7-8), 1045-1057.

Yu, W. J., Lee, B. J., Nam, S. Y., Ahn, B., Hong, J. T., Do, J. C., Kim, Y. C., Lee, Y. S., & Yun, Y. W. (2004). Reproductive disorders in pubertal and adult phase of the male rats exposed to vinclozolin during puberty. *J Vet Med Sci*, 66(7), 847-853.

Zakowski, J. J., & Bruns, D. E. (1985). Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 21(4), 283-322.

Zhang, L., Li, L., Jiao, M., Wu, D., Wu, K., Li, X., Zhu, G., Yang, L., Wang, X., Hsieh, J. T., & He, D. (2012). Genistein inhibits the stemness properties of prostate cancer cells through targeting Hedgehog-Gli1 pathway. *Cancer Lett*, 323(1), 48-57.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Zucker, I., Wade, G. N., & Ziegler, R. (1972). Sexual and hormonal influences on eating, taste preferences, and body weight of hamsters. *Physiol Behav*, 8(1), 101-111.