



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE BADJI-MOKHTAR  
-ANNABA-

جامعة باجي مختار - عنابة -

FACULTE DES SCIENCE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT** 3<sup>ème</sup> cycle (LMD) en

Reproduction & Développement

Spécialité : Biologie Animale Environnementale

**Intitulé**

**L'effet du Di-n-Butyl Phthalate (DBP) sur les paramètres  
hématologiques, biochimiques et les paramètres de la  
reproduction chez le lapin mâle *Oryctolagus Cuniculus*.**

Présentée Par : M<sup>lle</sup>. Lamia RIHANI

**Jury :**

**Président :** M. Cherif ABDENOUR.....Pr., Univ. Annaba

**Directeur de la thèse :** M. Kamel KHELILI.....Pr., Univ. Annaba

**Examineur :** M. Mohamed Salah BOULAKOUD.....Pr., Univ. Annaba

**Examineur :** M. Nacer BAAZIZ.....MCA, Univ. Canstantine 1

**Examinatrice :** Mme. Djahida MEHDI.....MCA, Univ. Oum El Bouaghi

**Examineur :** M. Khenouf SEDIK.....Pr., Univ. Sétif

**Année universitaire**

2013/2014

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تأثير DBP على القياسات الدموية، البيوكيميائية و التكاثرية عند

ذكور الأرانب البالغين من سلالة «*oryctolagus cuniculus*» .

بينت النتائج المتحصل عليها بعد إعطاء جرعات متزايدة 250/ 500/ 750 ملغ/كغ للأرانب لمدة أربعة أسابيع عن طريق الفم (الشرب) أن DBP يؤثر على الخصائص الدموية (تناقص الكريات الدموية الحمراء ، الهيموغلوبين ، هيماتوكريت إضافة إلى انخفاض في نسبة الحديد في الدم) ،تأثير كبدي (زيادة في وزن الكبد، تأثير نسيجي على الكبد و زيادة في مستويات أنزيمات المصل AST و ALT و زيادة في البيليروبين)، و تأثير كلوي (زيادة في الوزن المطلق الكلي و زيادة في مستويات الكيراتينين و اليوريا). نتائجنا تظهر أيضا وجود تغيير في بعض القياسات البيوكيميائية بعد إضافة DBP ( إنخفاض الدهون الثلاثية و الكلسترول و زيادة مستويات البروتين الكلى ، الألبومين ، البيليروبين و الجلوكوز).

و قد تبين من دراستنا إن DBP له تأثير على عوامل الأكسدة، و تبين ذلك من خلال الانخفاض في النشاط الأنزيمي من الجلوتاثيون البريخي من ناحية، و من ناحية أخرى، من خلال زيادة مستويات MDA).

بالإضافة إلى ذلك يبين هذا العمل أن DBP يسبب تأثير على خصائص التكاثر (انخفاض الوزن المطلق للخصية والبريخ، انخفاض في تركيز و حيوية و سرعة و حركية الحيوانات المنوية بالإضافة إلى انخفاض في مستويات التستوسترون متبعة بتأثير نسيجي على مستوى الخصية و البريخ) مما يؤدي إلى انخفاض في نسبة الخصوبة.

الكلمات الدالة : التكاثر، الأرانب ، السمية ، الاضطرابات الغدية ، DBP



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## **ABSTRACT**

The objective of this work is to evaluate the toxic effect of di-n-butyl phthalate (DBP) on hematological, biochemical and reproduction parameters in male adult rabbits *Oryctolagus cuniculus*.

The results obtained after oral exposure of DBP, (250, 500, 750 mg/kg/day) to rabbits for a period of 4 weeks, show that DBP induces hematotoxic effect (decrease in the number of red blood cells, hemoglobin and hematocrit accompanied by a decrease in iron); hepatotoxicity effect (increase in the liver weight and induced liver injury, by an increase in the rate of serum enzymes AST and increased ALT and bilirubin); renal effect (increase in the absolute kidneys weight and increase in the levels of creatinine and urea). In addition, the DBP provokes a modification in biochemical parameters as (decrease of triglyceride, cholesterol, and increased levels of total proteins, albumin, bilirubin and glucose).

Moreover, the DBP has a generally pro-oxidant effect, this is revealed by the decrease in the enzymatic activity of glutathione epididymal peroxidase GPx and by increasing MDA levels (an index of lipid peroxidation).

In addition, the present my work shows that DBP may cause toxic reproductive effect (decreased of testis and epididymis weights; number, mobility, speed and vitality of spermatozoa; histological alterations in testis and epididymis and decreased levels of testosterone) and therefore the induction of infertility.

**Key words:** reproduction, rabbit, toxicity, DBP, endocrine disruptor.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## **Résumé :**

L'objectif de ce travail, est d'évaluer l'effet toxique du DBP sur les paramètres hématologiques, biochimiques et sur les paramètres de la reproduction chez le lapin mâle adulte *Oryctolagus cuniculus*.

Les résultats obtenus, après l'administration des doses croissantes du DBP à raison de (250, 500, 750 mg/kg/j) par gavage durant 4 semaines, montrent que le DBP exerce un effet hématotoxique (la diminution du nombre des globules rouges, hémoglobine et hématocrite accompagnée à une diminution du taux du fer sérique) ; hépatotoxique (augmentation du poids absolu du foie et une atteinte tissulaire d'une part. D'autre part, une augmentation du taux des enzymes sérique AST et ALT) ; un effet rénal (augmentation du poids absolu des reins et une augmentation du taux de la créatinine et de l'urée).

Un changement au niveau de quelques paramètres biochimiques a été également observé après l'administration du DBP, (diminution du taux de triglycéride, cholestérol, et augmentation du taux de protéines totale, albumine, bilirubine et du taux de glucose). De plus, le DBP exerce un effet globalement pro-oxydant, ceci est révélé par la diminution du taux de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase GPx au sein de l'épididyme d'une part, et d'autre part, par l'augmentation du taux de MDA (indice de la peroxydation lipidique).

En outre, le présent travail montre que, le DBP a un effet reprotoxique (la diminution du poids absolu des testicules et de l'épididyme ; la diminution du nombre, mobilité, vitesse et vitalité des spermatozoïdes ; une altération histologique au niveau des testicules et l'épididyme ainsi qu'une diminution du taux de la testostérone) et par conséquence l'induction de l'hypofertilité.

**Mots clés :** reproduction, lapin, toxicité, DBP, perturbateur endocrinien.



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## **Remerciements**

*Au terme de cette recherche, je suis heureuse de pouvoir remercier tous et celles qui m'ont accompagné et soutenu tout long de cette aventure.*

*Je tiens à remercier tout d'abord Allah le tout puissant d'avoir éclairé mon chemin et d'avoir guidé mes pas, et qui sans lui ne nous sommes rien.*

*Je voudrais remercier mon encadreur, monsieur KHELILI Kamel professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée. Hommages respectueux.*

*Je tiens également à remercier monsieur ABDENOUR Cherif de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de la thèse, veuillez trouver l'expression de mon plus profond respect et de mes sincères remerciements.*

*Je tiens à adresser mes très sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.*

*Je tiens à remercier également madame LACHKHAB Yussria pour son amical accueil, sa gentillesse et pour ses conseils de ce travail. Et à monsieur TAHAR Ali professeur à l'université d'Annaba pour son aide pour mes analyses statistiques.*

*Merci à M<sup>lle</sup> BENCHIKH Rym technicienne de laboratoire écophysiologie animale pour son amitié, sa gentillesse, ses efforts et ses aides introuvables ces jours.*

*Je remercie mes collègues et mes amis pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble.*

*Enfin merci à ma famille qui a toujours fait bien plus que me soutenir et m'encourager. A ma mère pour tout ce qu'elle m'a encouragé et écouté à d'innombrables reprises. A mes sœurs et mes frères.*

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## *Dédicace*

*Je dédie cet humble travail à :*

*A mes parents*

*A mes sœurs et mes frères*

*A tout ce qui me sont chères...*

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

---

**TABLE DES MATIERES**

<i>Introduction générale</i> .....	1
<b>CHAPITRE I- PARTIE THEORIQUE</b>	
<b>1. Le Di-n-butyl Phthalate</b> .....	7
1.1. Définition et utilisation du DBP.....	7
1.2. Les caractères physico-chimiques du DBP.....	8
<b>2. Les voies d'exposition au DBP</b> .....	9
2.1. La voie digestive .....	10
2.2. La voie respiratoire.....	10
2.3. La voie cutanée.....	10
<b>3. Toxicocénitique du DBP</b> .....	11
3.1. Absorption.....	11
3.2. Distribution.....	11
3.3. Métabolisme.....	12
3.4. Elimination.....	15
<b>4. Toxicité générale du DBP</b> .....	15
4.1. Toxicité aiguë.....	15
4.2. Toxicité subchronique.....	16
4.3. Toxicité chronique.....	16
<b>5. Les principaux effets toxiques du DBP</b> .....	17
5.1. Effets du DBP sur le foie.....	17
5.2. Effets du DBP sur la thyroïde et le système immunitaire.....	18
5.3. Effets du DBP sur la reproduction.....	19
5.3.1. Chez la femme.....	19
5.3.2. Chez l'homme.....	19
5.3.2.1. Altération de la fonction stéroïdienne.....	20
5.3.2.2. Altération de la fonction gamétogénèse.....	20
5.4. Effets du DBP sur le développement.....	21

---

5.5. Génotoxicité.....	22
5.6. Effet cancérigène.....	23
<b>6. Mécanismes d'action du DBP.....</b>	<b>23</b>
<b>CHAPITRE II-PARTIE MATERIELS &amp; METHODES</b>	
<b>1. Matériels.....</b>	<b>25</b>
1.1. Matériel biologique.....	25
1.2. Condition d'élevage.....	25
1.3. Classification de l'animale.....	26
<b>2. Méthodologie.....</b>	<b>26</b>
2.1. Traitement (la solution du dosage).....	26
2.2. Protocole expérimentale.....	27
<b>3. Préparation des prélèvements.....</b>	<b>29</b>
3.1. Prélèvement sanguin.....	29
3.2. Prélèvement des organes.....	29
<b>4. Etudes de quelques paramètres de la reproduction.....</b>	<b>30</b>
4.1. Concentration des spermatozoïdes.....	30
4.2. Mobilité des spermatozoïdes.....	31
4.3. Vitesse de spermatozoïdes.....	31
4.4. Vitalité des spermatozoïdes.....	32
4.4.1. Test de coloration vitale des spermatozoïdes.....	32
4.4.2. Test du gonflement hypo osmotique des spermatozoïdes.....	32
<b>5. Dosage hormonal.....</b>	<b>34</b>
5.1. Dosage de la testostérone.....	34
<b>6. Dosage des paramètres biochimiques.....</b>	<b>36</b>
6.1. Dosage du glucose.....	36
6.2. Dosage des protéines totales.....	38
6.3. Dosage d'albumine.....	39
6.4. Dosage des triglycérides.....	40

6.5. Dosage du cholestérol.....	42
6.6. Dosage de la créatinine.....	43
6.7. Dosage de l'urée.....	45
6.8. Dosage de la bilirubine totale.....	46
6.9. Dosage du fer sérique.....	48
6.10. Dosage d'Aspartate-Aminotransférase.....	49
6.11. Dosage d'Alanine-Aminotransférase.....	51
<b>7. Dosage des paramètres du stress oxydant.....</b>	<b>52</b>
7.1. Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-PX).....	52
7.2. Dosage de malondialdéhyde (MDA).....	53
<b>7. Techniques histologiques.....</b>	<b>54</b>
<b>9. Etude statistique.....</b>	<b>69</b>
 <b>CHAPITRE III-PARTIE RESULTATS</b>	
<b>1. Les paramètres de croissance.....</b>	<b>61</b>
1.1. Poids corporel.....	61
1.2. Poids absolu de certains organes.....	62
1.2.1. Poids absolu des testicules.....	62
1.2.2. Poids absolu de l'épididyme.....	63
1.2.3. Poids absolu du foie.....	64
1.2.4. Poids absolu des reins.....	65
<b>3. Les paramètres hématologiques.....</b>	<b>66</b>
<b>4. Etude biologique des spermatozoïdes.....</b>	<b>68</b>
4.1. Variation de la concentration des spermatozoïdes ( $\times 10^6/\text{ml}$ ).....	67
4.2. Variation du taux de la mobilité des spermatozoïdes (%).....	68
4.3. Variation de la vitesse des spermatozoïdes ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ).....	69
4.4. Variation de la vitalité des spermatozoïdes (%).....	70
4.4.1. Coloration vitale des spermatozoïdes.....	70
4.4.2. Les malformations morphologiques des spermatozoïdes.....	71

<b>5. Paramètre hormonal.....</b>	<b>73</b>
5.1. Variation du taux plasmatique de la testostérone.....	73
<b>6. Etude biochimique.....</b>	<b>74</b>
6.1. Taux plasmatique du glucose.....	74
6.2. Taux plasmatique des protéines totales.....	75
6.3. Taux plasmatique d'albumine.....	76
6.4. Taux plasmatique des triglycérides.....	77
6.5. Taux plasmatique du cholestérol.....	78
6.6. Taux plasmatique de la créatinine.....	79
6.7. Taux plasmatique de l'urée.....	80
6.8. Taux plasmatique de la bilirubine totale.....	81
6.9. Taux plasmatique du fer sérique.....	82
6.10. Taux sérique d'Aspartate-Aminotransférase.....	83
6.11. Taux sérique d'Alanine-Aminotransférase.....	84
<b>7. Etude des paramètres du stress oxydant.....</b>	<b>85</b>
7.1. Taux du glutathion peroxydase (GSH-px) dans l'épididyme.....	85
7.2. Taux de malondialdéhyde (MDA) dans l'épididyme.....	86
<b>8. Etude histologique.....</b>	<b>87</b>
8.1. Etude histologique des testicules.....	87
8.2. Etude histologique de l'épididyme.....	89
8.3. Etude histologique du foie.....	91
 <b>CHAPITRE IV-DISCUSSION</b>	
<b>Discussion.....</b>	<b>93</b>
<b>Conclusions générales et perspectives.....</b>	<b>105</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>107</b>



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

**Liste des abréviations**

<b>ALAT : Alanine-Alaninetransférase</b>
<b>ASAT : Aspartate-Aminotransférase</b>
<b>AR : Récepteur à Androgène</b>
<b>BBP: Butyl-Benzyl Phthalate</b>
<b>CAS : Chemical Abstracts Service</b>
<b>CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine</b>
<b>CGMH : Concentration Globulaire Moyenne en Hémoglobine</b>
<b>CHE : Cholestérol estérase</b>
<b>CHOD : Cholestérol oxydase</b>
<b>CL50 : Concentration Létale Moyenne</b>
<b>DBP: Di-n-Butyl Phthalate</b>
<b>DEHP: Di-2-Ethylhexyl Phthalate</b>
<b>DEP: Di-Ethyl Phthalate</b>
<b>DiBP: Di-isobutyl Phthalate</b>
<b>DL50 : Dose Létale Moyenne</b>
<b>DMP: Di-Methyl Phthalate</b>
<b>DO : Densité optique</b>
<b>DOTP: DiOctyl-Tere Phthalate</b>
<b>EDTA: Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid</b>
<b>FSH : Hormone Folliculo-Stimulante</b>
<b>GOD: Glucose oxydase</b>
<b>GSH-px : Glutathion Peroxydase</b>
<b>IgG : immunoglobuline G</b>
<b>Jpp : Jours post partum</b>
<b>LH: Hormone Lutéinisante</b>
<b>LOAEL: Lowest-Observed-Adverse-Effect Level</b>
<b>NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule</b>
<b>NOAEC: No Observed Adverse Effect Concentration</b>

<b>NOAEL: No Observable Adverse Effect Level</b>
<b>MBP: Mono-Butyl Phthalate</b>
<b>MDA: Malondialdehyde</b>
<b>MEHP: Mono (2-éthyl-5-hydroxyhexyl) Phtalate</b>
<b>Mg/kg (P.C) : Milligramme/ kilogramme de poids corporel</b>
<b>OMS: Organisation Mondiale de la Santé</b>
<b>Pc : Poids corporelle</b>
<b>PM: Poids Moleculaire</b>
<b>POD : Peroxydase</b>
<b>PPAR<math>\alpha</math>: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</b>
<b>Ppm : Partie par million</b>
<b>PVCs: PolyVinyl Chlorydes</b>
<b>RT : Réactif</b>
<b>TBA : Acide Trichloracétique</b>
<b>TCA : Acide Thiobarbiturique</b>
<b>TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine</b>
<b>TGO : Glutamooxaloacétate Transférase</b>
<b>TGP : Glutamopyruvate Transférase</b>
<b>TMB: Tetraméthylbenzidine</b>
<b>VGM : Volume Globulaire Moyen</b>

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

**Liste des Tableaux**

<b>N°</b>	<b>Tableau</b>	<b>page</b>
<b>Tableau 1</b>	Propriétés physico-chimiques du DBP	<b>09</b>
<b>Tableau 2</b>	Classification de l'animale	<b>26</b>
<b>Tableau 3</b>	Les variations des paramètres sanguine chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales	<b>66</b>

**Liste des Figures**

<b>N°</b>	<b>Figure</b>	<b>page</b>
<b>Figure 1</b>	La structure chimique du DBP	<b>08</b>
<b>Figure 2</b>	Schéma métabolique du DBP	<b>14</b>
<b>Figure 3</b>	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	<b>28</b>
<b>Figure 4</b>	Présentation schématique des modifications morphologiques caractéristiques des spermatozoïdes exposés à un stress hypo-osmotique	<b>33</b>
<b>Figure 5</b>	Poids corporel (g) des lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>61</b>
<b>Figure 6</b>	Poids absolu des testicules (g) des lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>62</b>
<b>Figure 7</b>	Poids absolu de l'épididyme (g) des lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>63</b>
<b>Figure 8</b>	Poids absolu du foie (g) des lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>64</b>
<b>Figure 9</b>	Poids absolu des reins (g) chez les lapins témoins et traités par	<b>65</b>

	trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	
<b>Figure 10</b>	Concentration des spermatozoïdes ( $\times 10^6/\text{ml}$ ) chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>67</b>
<b>Figure 11</b>	Mobilité des spermatozoïdes (%) chez les lapins témoin et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>68</b>
<b>Figure 12</b>	Vitesse des spermatozoïdes chez les lapins témoins et traités aux trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>69</b>
<b>Figure 13</b>	Vitalité de spermatozoïdes chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>70</b>
<b>Figure 14</b>	Malformations au niveau du flagelle et la pièce intermédiaire des lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>72</b>
<b>Figures 15</b>	Taux de la testostérone chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>73</b>
<b>Figures 16</b>	Taux plasmatique du glucose (g/l) chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>74</b>
<b>Figures 17</b>	Taux plasmatique des protéines chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>75</b>
<b>Figures 18</b>	Taux plasmatique d'albumine chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>76</b>
<b>Figures 19</b>	Taux plasmatique de triglycéride chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>77</b>
<b>Figures 20</b>	Taux plasmatique du cholestérol chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>78</b>

<b>Figures 21</b>	Taux plasmatique de la créatinine chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>79</b>
<b>Figures 22</b>	Taux plasmatique de l'urée chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales	<b>80</b>
<b>Figures 23</b>	Taux plasmatique de la bilirubine totale chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>81</b>
<b>Figures 24</b>	Taux plasmatique du fer sérique chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>82</b>
<b>Figures 25</b>	Taux d'Aspartate Aminotransférase chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>83</b>
<b>Figures 26</b>	Taux d'Alanine aminotransférase chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>84</b>
<b>Figures 27</b>	Taux du GSH-px dans l'épididyme chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>85</b>
<b>Figures 28</b>	Taux de MDA dans l'épididyme chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>86</b>
<b>Figure 29</b>	Coupes histologiques des testicules chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>88</b>
<b>Figure 30</b>	Coupes histologiques de l'épididyme chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>90</b>
<b>Figure 31</b>	Coupes histologiques du foie chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales	<b>92</b>



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## **Introduction générale**

La reproduction est une fonction biologique fondamentale, qui assure la continuité et la diversité des espèces. Chez les mammifères, la fonction de la reproduction masculine est assurée essentiellement par les testicules, organes complexes qui assurent deux rôles majeurs, la spermatogénèse et la stéroïdogénèse. La spermatogénèse consiste à produire des spermatozoïdes fonctionnels à partir de spermatogonies souches, alors que la stéroïdogénèse correspond à la production des stéroïdes responsables du développement des organes génitaux internes et externes ainsi que de l'établissement et du maintien des caractères sexuels secondaires (**Muczynski, 2011**).

Au cours de ces dernières décennies, sont apparues des changements parfois irréversibles dans l'environnement immédiat et climatique, dû à l'utilisation excessive des produits toxiques. Ces changements dans l'environnement ont menés à des recherches dont, le but est de savoir les conséquences de ces produits sur l'une des fonctions les plus élémentaires dans la vie de l'homme, qui est la fonction de la reproduction (**Delbès *et al.*, 2006**).

Les études dans ce domaine, ont indiqué que l'environnement représenté par la qualité de l'air, de l'eau et du sol, à des répercussions directes sur la chaîne alimentaire et par conséquent, sur les êtres humains, qui se trouvent en haut-lieu de cette chaîne (**Muczynski, 2011**). Les substances qui perturbent le système endocrinien, pourraient être l'indicateur de l'apparition de maladies liées au système hormonal. Parmi ces maladies, on cite notamment dans plusieurs pays (Europe, Etats-Unis...) des cas de cancers (testicules, prostate...), baisse de la fertilité masculine et de malformation des organes reproducteurs mâles (hypospadias et cryptorchidie) (**Kavlock *et al.*, 1996**).

Les polluants environnementaux, peuvent être présents sous différentes formes (atmosphérique, chimique, organique, industrielle...). Ils sont de nature très variée et nombre d'entre eux étant classés comme irritants, cancérigènes, mutagènes et/ou perturbateurs endocriniens (**Muczynski, 2011**).

Justement, les perturbateurs endocriniens sont des composés chimiques exogènes. Ils se définissent comme étant des agents d'origine anthropique ou naturelle. Ils sont capables d'altérer le fonctionnement endocrinien normal en imitant (un agoniste) ou en inhibant (un antagoniste) les actions des hormones endogènes ou en modulant la synthèse hormonale. Les perturbateurs endocriniens interfèrent avec la synthèse, le stockage, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la fixation et l'action biologique (**Kavlock et al., 1996**). Il a été également montré que les perturbateurs endocriniens agissent en éliminant les hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie des processus du développement et/ou du comportement chez l'êtres humain et chez la faune aussi (**Kavlock et al., 1996**).

Plusieurs études ont été menées dans le but est de montrer que, la baisse de la fertilité masculine dans la population générale, est significativement associée à une altération de la qualité du sperme (volume, mobilité et nombre de spermatozoïdes). Cette baisse serait due à une présence exponentielle des concentrations des substances toxiques dans notre environnement (**Jaakkola et al., 2008**).

Il faut dire que l'industrie notamment pétrochimique et chimique en expansion durant les deux derniers siècles et surtout le XIème siècle, avec la montée de la consommation mondiale, a engendré une utilisation drastique et intensive des produits chimiques. Ces produits sont utilisés dans la fabrication d'objets d'usage courant comme les jouets, les cosmétiques, les matériels médicaux, etc... (**Damstra et al., 2002**). Cette utilisation a fait que, l'être humain (travailleur, transporteur, grossiste, consommateur...) est exposé davantage aux

effets troubles des polluants. Les études épidémiologiques réalisées chez l'homme depuis plusieurs années dans différents pays, l'Europe, les Etats-Unis, le Japon notamment, ont montré qu'il ya une relation entre l'augmentation de la fréquence des anomalies du développement de la fonction de la reproduction masculine et l'utilisation intensive des produits chimiques en tous genres (**Damstra et al., 2002**).

Il est tout à fait clair que l'utilisation de plus en plus courante de produits chimiques variés, ayant un caractère de perturbateurs endocriniens ou non et qui se retrouvent en concentration croissante dans l'environnement, semble être l'une des causes majeures dans la diminution de la fertilité masculine (**Jaakkola et al., 2008**). Compte tenu de la multiplicité des composés chimiques, pouvant ainsi se retrouver répandus dans l'environnement, ce phénomène représente désormais un enjeu de santé publique dans toutes les sociétés notamment celles les plus industrialisées ; productrices et/ou consommatrices. Parmi les perturbateurs endocriniens qui peuvent altérer la fonction de la reproduction, on trouve les phthalates. Ces derniers font partie d'une famille de produits chimiques, constitués d'un anneau benzénique et de deux groupements carboxylates générant une structure de type diester (**Saint-Laurant & Rhainds, 2004**). Ces composés sont en très grande majorité issus de l'industrie du plastique, pour une production dépassant plusieurs millions de tonnes par an à l'échelle mondiale (**Muczynski, 2011**).

Les phthalates sont apparus dans les années 1920 en remplacement du camphre, qui était alors le plastifiant utilisé dans la synthèse du nitrate de cellulose. Dès 1931, les phthalates ont été utilisés dans le procédé de plastification des PVCs (PolyVinyl Chlorure) comme fluidifiants de ces composés. On les retrouve à l'heure actuelle dans un grand nombre de composés contenant des PVC (ce qui représente 90% de l'utilisation des phthalates). Ils rentrent également dans la fabrication de jouets, d'adhésifs et de colles, de peintures

industrielles, de revêtements de surface, d'encre d'imprimante, d'insecticides, d'emballages plastiques, de détergents et de solvants. On les trouve également dans différents produits cosmétiques tels que les parfums, les déodorants, les vernis à ongles et laques pour cheveux. Certains appareillages médicaux, emballages de médicament et poches de transfusion sanguine contiennent également des doses élevées de phtalates (**Hauser et al., 2004; Koo & Lee, 2004; Heudorf et al., 2007**) ce qui par conséquent se répercutera encore plus sur la santé des patients.

Depuis les années 70, les phtalates sont accusés en tant que produits toxiques. Bien que certains soient considérés comme inoffensifs tels que le DEP (DiEthyl Phthalate), le DMP (DiMethyl Phthalate) et le DOTP (DiOctyl Tere-Phthalate), d'autres par contre sont clairement reconnus depuis plusieurs années comme des substances toxiques (**Liu et al., 2005**). En effet, depuis mars 2001, le DEHP (di-2-ethylhexyl phthalate) et le DBP (Di-n-ButylPhtalate) sont officiellement classés auprès de la Commission Européenne comme : *substances toxiques de catégorie 2*. La catégorie 2 est définie comme une : Substance devant être assimilée comme substances cancérigènes pour l'Homme concernant la fonction de la reproduction, sous la labellisation *R61* « Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant ». En dernier, le BBP (Butyl BenzylPhtalate) a rejoint cette catégorie en juin 2004.

Des études ont démontré, que les phtalates ont été trouvés à l'intérieur de l'air et de la poussière (**Rudel et al., 2001**). D'autres ont montré leur présence dans le lait maternel (**Hines et al., 2009**), dans l'urine humaine (**Meeker et al., 2009**) et dans des échantillons de sang (**Kato et al., 2003**). Un fait important démontré par l'étude de **Janjua et al., (2008)**, que les phtalates sont rapidement absorbés par la peau et peuvent également pénétrer dans le corps

grâce soit à l'ingestion à l'inhalation soit d'une manière plutôt associé aux produits paramédical (emballages des médicaments, les poches de perfusion...) (**Schettler et al., 2005**).

En raison des effets complexes des phthalates sur plusieurs systèmes hormonaux comme celui de l'axe œstrogénique et androgénique, et lors d'études cellulaire *in vitro*, il a été montré que certains d'entre-deux, dont le BBP et le DBP, semble agissent faiblement sur les œstrogènes (**Jobling et al., 1995**). Des années après, l'étude de **Borch et al., (2006)** a montré que les phthalates peuvent interagir avec les récepteurs androgéniques (**Fang et al., 2003**). Au cours du développement fœtal, les phthalates traversent le placenta humain, ce qui laisse le fœtus exposé aux dangers de ces produits toxiques pendant cette période critique du développement embryonnaire (**Wittassek et al., 2009**). En France et dans le nord de l'Amérique, des quantités mesurables de sept différents phthalates ont été trouvés chez de jeunes nourrissons (**Sathyanarayana et al., 2008**). Ces recherches montrent bien à quel point ces produits toxiques peuvent se retrouver dans les organismes humains. Ce qui leur confère une assimilation très facile.

Dans notre étude, on s'est intéressé spécifiquement aux phthalates pour diverses raisons : 1) ils sont très répandus dans l'environnement ; 2) leur concentration a été mesurée dans de nombreux fluides biologiques humains ; 3) les données expérimentales utilisant le modèle rongeur et montrant une reprotoxicité des phthalates sont très nombreuses ; 4) quelques données épidémiologiques humaines suggèrent un effet reprotoxique de certains phthalates aux concentrations retrouvées dans l'environnement, au moins durant la vie néonatale.

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé le composé chimique : le Di-n-butyl phthalate (DBP) chez le lapin mâle adulte *Oryctolagus cuniculus*.

Le DBP est une substance synthétique, largement utilisé par l'homme, essentiellement comme plastifiant pour les matières plastiques et élastomères, en particulier les polymères de chlorure de vinyle, d'acétate de vinyle et de cellulose. Son utilisation dans la vie courante est pratiquement généralisé comme en témoigne sa présence dans les emballages alimentaires et dans de nombreux produits cosmétiques (Koo *et al.*, 2004).

Le but de ce travail est de donner un aperçu détaillé de ce produit chimique (DBP) et de démontrer ses effets sur la santé reproductive masculine. Plusieurs paramètres biologiques, notamment hématologiques, biochimiques et les paramètres de la reproduction ont été réalisé afin d'étudier l'effet du DBP chez le lapin mâle adulte *Oryctolagus cuniculus*. Après une introduction générale, notre travail comporte quatre parties distinctes à savoir.

- I- **Etude bibliographique** : consacrée à l'identification de substance (DBP), propriété physico-chimique, utilisation, toxicité générale, son effet sur la reproduction et développement.
- II- **Matériels et méthodes** : consacrée à la présentation du matériel biologique et non biologique ainsi que le protocole adoptée aux différente méthodes analytique des paramètres hématologiques, biochimiques, histologiques, qualité du sperme et de dosage hormonal.
- III- **Résultats** : partie réservée à la présentation des résultats obtenus sous forme des tableaux, histogrammes et des microphotographies des paramètres étudiés.
- IV- **Discussion** : dans cette dernière partie, on a interprété et discuter les résultats par une méthodologie scientifique, claire et objective en se basent sur une bibliographie nombreuse et actualisée.

En fin, nous présentons une conclusion générale suivie des références bibliographiques.



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## I-Etude bibliographique

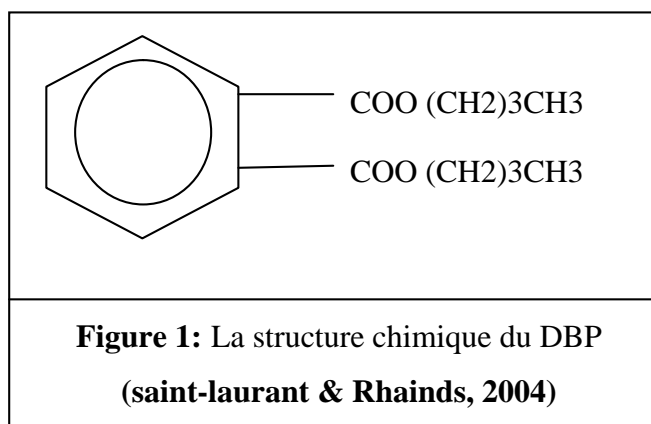
### 1. Le Di-n-Butyl Phthalate (DBP)

#### 1.1. Définition et utilisation

Le DBP membre de la famille des phthalates, est une substance synthétique, largement utilisé par l'industrie comme plastifiant (pour rendre les matières plastiques plus flexibles, plus résistantes, ou plus faciles à manipuler), et comme élastomères (caoutchouc synthétique). Il entre dans la composition en particulier des polymères de chlorure de vinyle, d'acétate de vinyle et de cellulose (INRS, 2003). Il est constitué d'un anneau benzénique et de deux groupements carboxylates générant une structure de type diester (saint-laurant & Rhainds, 2004). Voir Figure 1.

L'utilisation du DBP dans la vie courante est pratiquement généralisée comme en témoigne sa présence dans les emballages alimentaires et dans de nombreux produits cosmétiques. Il est utilisé dans la fabrication des films plastiques, des revêtements de sol et muraux. On le trouve également dans la structure des toitures, des tuyaux souples, des tubes et des câbles. Il entre aussi dans la fabrication des semelles de chaussure (WHO, 1996). On le trouve aussi dans des produits sans PVC, comme les adhésifs, les mastics, les peintures, les lubrifiants, la résine. Comme produits cosmétiques, il est largement présent dans les vernis à ongles et les parfums. Enfin, dans des bombes aérosols, il assure la suspension des corps solides, et la prévention de la formation de la mousse (WHO, 1996).

Il a été démontré que le DBP est considéré comme un excellent solvant pour de nombreux colorants solubles dans l'huile. Ainsi qu'il entre dans la composition chimique des insecticides, les peroxydes et autres composés organiques. Il est considéré comme un agent anti-mousse et lubrifiant de fibres dans la fabrication textile (WHO, 1997).



## 1.2. Les caractères physico-chimiques du DBP

Le DBP est un liquide inerte, incolore, huileux avec une basse pression de vapeur. Il est très soluble dans la plupart des solvants organiques (acétone, benzène, alcool et éther), mais pratiquement insoluble dans l'eau (INRS, 2003).

Dans des conditions normales d'emploi, le DBP est un produit stable, à température élevée. Il se trouve que sa décomposition peut donner naissance à de l'anhydride phtalique. Le DBP peut réagir dangereusement avec les agents oxydants forts, mais il n'est pas considéré comme corrosif à l'égard des métaux (INRS, 2003). Le DBP est produit par la réaction de n-butanol et l'anhydride phtalique.

Le Tableau N°1 résume certaines propriétés physico-chimiques du DBP (ATSDR, 2001).

**Tableau 1 : propriétés physico-chimiques du Di-n-butyl phthalate**

propriétés	DBP
<b>Aspect</b>	Liquide incolore, huileux
<b>Poids moléculaire (g/mol)</b>	278 ,345
<b>Point d'ébullition (C°)</b>	340
<b>Point de fusion (C°)</b>	-35°C
<b>Pression de vapeur (Pa)</b>	9,7±3 ,3 à 25°C
<b>Densité</b>	1,04
<b>Solubilité dans l'eau</b>	10 mg/l à 20°C
<b>Log K octane l/l'eau</b>	4,72
<b>Facteur de conversion</b>	1 ppm = 11,4 mg/m <sup>3</sup>

## 2. Les voies d'exposition au DBP

Il est à noter que les voies d'exposition au DBP sont multiples. Au 1<sup>er</sup> degré se trouve les personnes actives, c'est-à-dire celles qui travaillent dans l'industrie et toute la chaîne de distribution. Au 2<sup>ème</sup> degré viennent ensuite, les consommateurs qui sont (hommes, femmes, enfants, nourrissons, malades...). En dernier, la contamination peut venir via l'environnement directement.

L'exposition au DBP peut se faire par inhalation, par voie digestive ou par contact cutané. La voie orale est celle qui prédomine largement (WHO, 1997). Le DBP est un

composé qui se lie d'une façon non covalente au plastique. Il peut de ce fait, diffuser librement ce qui entraîne l'existence de multiples sources d'exposition (IPCS, 1997).

### **2.1. La voie digestive**

L'ingestion d'éléments nutritifs, contenant du DBP, ayant librement diffusé depuis leurs emballages, constitue le mode le plus représentatif des voies d'expositions. En effet, plusieurs études ont montré sa présence dans différents produits alimentaires ainsi que dans l'eau de bouteille. Cela montre que, le DBP avait migré depuis ses contenants. Cette migration peut avoir lieu notamment au moment du conditionnement et du stockage de denrées alimentaires (Page & Lacroix, 1995; Petersen & Breindahl, 2000; Heudorf *et al.*, 2007).

### **2.2. La voie respiratoire**

L'inhalation de particules contaminées contenant du DBP, constitue le deuxième mode d'exposition. Différentes études ont démontré la présence du DBP dans l'air ainsi que dans les poussières domestiques provenant majoritairement des matériaux de construction et des éléments synthétiques tels que, les revêtements de sol ou les peintures (Clausen *et al.*, 2004; Fromme *et al.*, 2004; Bornehag *et al.*, 2005).

### **2.3. La voie cutanée**

Une contamination transdermique est également possible dans le cas d'utilisation des produits cosmétiques contenant du DBP. Toutefois, cette forme d'exposition est largement minoritaire. Il est à noter qu'un taux élevé du DBP avait été dosé dans les poches de sang médicales (Wormuth *et al.*, 2006). La transfusion sanguine peut dès lors constituer une forte source ponctuelle de contamination.

### 3. Toxicocinétique

#### 3.1. Absorption

L'absorption des phthalates dépend de plusieurs facteurs. Parmi ces derniers, la dose et la voie d'exposition ainsi que la masse moléculaire du composé lui-même sans pris de considération. Le DBP, est un produit stable et d'une grande liposolubilité. Il est absorbé facilement quand il est ingéré ou lorsqu'il entre en contact avec la peau. Il a été démontré que le DBP est aussi bien absorbé par inhalation (**INRS, 2003**).

chez les rats, il est a été mentionné que le DBP serait bien absorbé par la voie digestive, puisque 48h après son administration orale, 90% de la dose du DBP s'est retrouvé dans les urines (**Foster et al., 1982**). Chez les hamsters, 73% de la dose oralement administrée du DBP a été excrété dans l'urine en 24 heures (**Foster et al., 1982**). Même l'absorption du DBP par la voie cutanée était rapide chez le rat. Il semble que ? la peau semble constituer un réservoir de ce composé chimique (**Payan et al., 2001**).

Comparé à l'Homme, l'absorption cutanée du DBP qui est de  $(0,07\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h})$  est bien inférieure à celle mesurée chez le rat  $(9,33\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h})$  (**Scott et al., 1987**).

#### 3.2. Distribution

Dans l'organisme, la distribution du DBP est rapide vers, les poumons, la rate, les tissus adipeux et plus particulièrement vers le foie et les reins. Des études ont montré qu'après 4 heures d'administration orale du DBP, son taux le plus faible a été relevé dans le cerveau (0,03%), alors que le taux le plus élevé a été mesurée au niveau des reins (0,66%). Il a été prouvé que le pic sanguin atteint son maximum au bout de 2 h. Après 4 h, la substance est distribuée dans tout l'organisme. Mais au-delà de 48 h, il s'avère qu'il ne subsiste dans l'organisme qu'à l'état de traces ( $<0,01\%$ ) (**INRS, 2003**).

Cela veut dire que le DBP ne s'accumule pas dans l'organisme du fait de sa demi-vie courte, qui est-il faut le dire variable selon les espèces animales (**Tanaka *et al.*, 1978; Williams & Blanchfield, 1975**).

Les métabolites du DBP peuvent se trouver également dans le tractus gastro-intestinal, le foie et les reins. Ces derniers sont considérés comme un système d'excrétion et non comme un dépôt (**Williams *et al.*, 1975**). Une partie des métabolites se retrouve aussi dans les tissus adipeux (**Okada *et al.*, 1978**), le cerveau, le cœur, les testicules, les poumons, les muscles (**INRS, 2003**). Au cours de la grossesse, les métabolites ont la capacité de passer via la barrière placentaire, ce qui produit leur accumulation chez le fœtus (**INRS, 2003**).

### **3.3. Métabolisme**

Le DBP, comme tout xénobiotique, va subir des réactions de biotransformations destinées à l'éliminer de l'organisme. Ce processus est classiquement formé de trois grandes étapes:

- a) la phase I : oxydation, réduction ou hydrolyse, destinée à rendre le xénobiotique polaire.
- b) la phase II : réaction de conjugaison à l'origine d'un composé hydrosoluble.
- c) la phase III : élimination.

Dans l'organisme, le DBP est rapidement métabolisé au cours d'une succession de réactions enzymatiques. Lors de la réaction de la phase I, le DBP est hydrolysé au niveau d'une des chaînes carbonées de sa structure en MBP (monobutyl phthalate) (Fig. 2). Ce métabolite primaire est considéré comme le composé biologiquement actif de DBP et serait responsable de sa toxicité (**Heindel & Powell, 1992**).

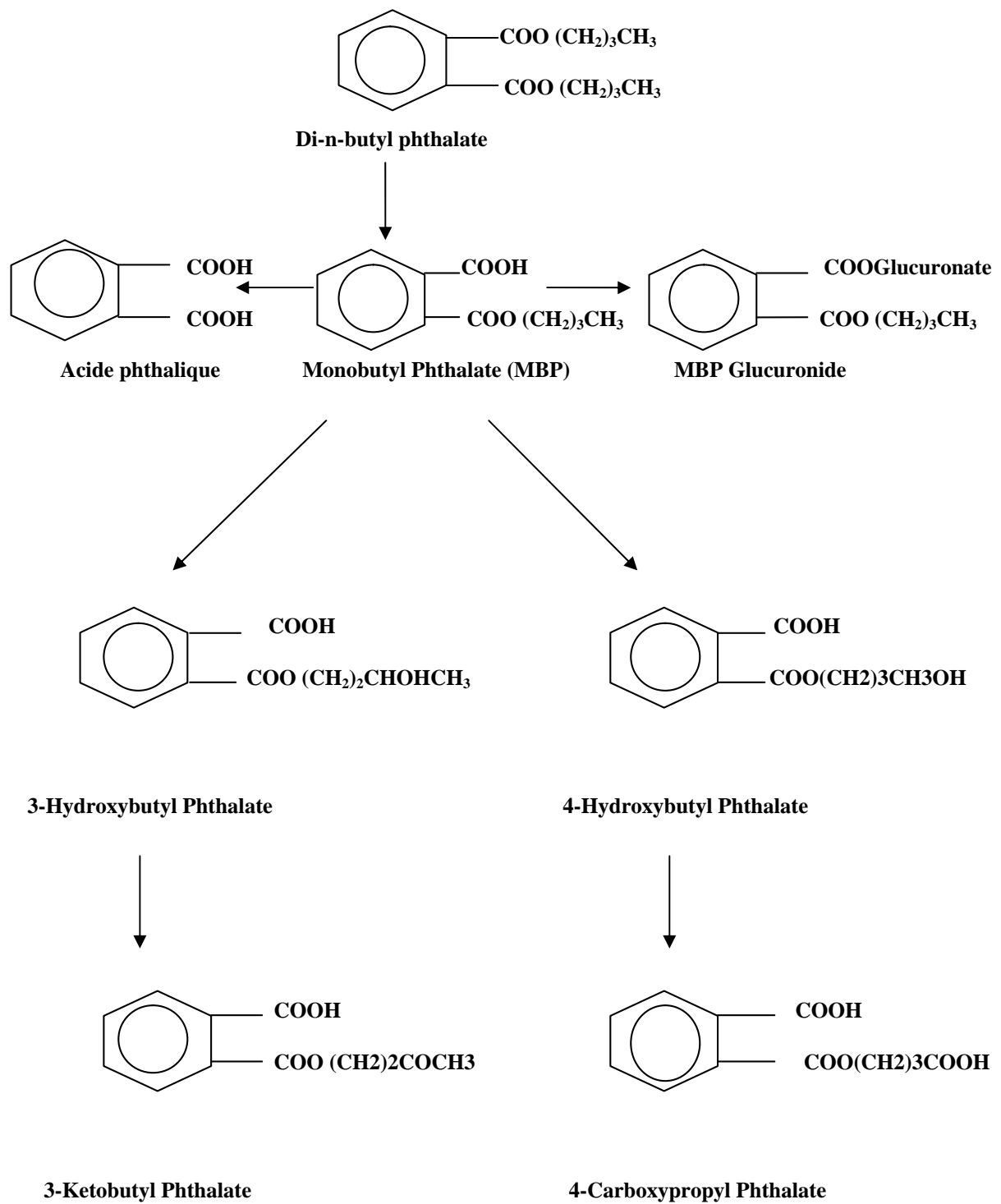
Cette première phase de métabolisation a lieu majoritairement au niveau gastro-intestinal et aussi au niveau des différents organes parenchymateux. Il sera catalysée par des

lipases et estérases hépatique, pancréatique et intestinale avant d'être absorbé (**Calafat & McKee, 2006; Rusyn et al., 2006; Frederiksen et al., 2007**). Cette hydrolyse peut survenir après l'absorption au niveau hépatique et rénal (**INRS, 2003**). Dans le sérum du rat, 80-90% du MBP total est libre, alors que le reste est glucuroconjugué (**Fennell et al., 2004**). Cependant, la situation est inversée chez les humains où 25 à 30% du MBP total dans le sérum est libre et le reste est représenté par le glucuronide conjugué (**Silva et al., 2003**).

Le MBP subit une série de métabolisations secondaires (principalement composées d'hydroxylation et d'oxydation) sur leur chaîne aliphatique carbonée, produisant une grande variété de monoesters secondaires. Ces métabolites secondaires sont facilement conjugables (**Albro et al., 1982; Astill, 1989**) sous l'action de l'uridine 5'-diphosphoglucoronyle transférase, qui fixe un élément glucoronide au niveau du groupement alcool du MBP. Il existe 6 métabolites secondaire formés à partir du MBP, dont le principale est un dérivé glucuro-conjugué (**Silva et al., 2003**). La conjugaison augmente le pouvoir hydrosoluble du métabolite ce qui facilite son excrétion dans les urines (**Silva et al., 2003; Koch et al., 2005**).

Le produit qui apparaît dans l'urine, est principalement MBP conjugué avec l'acide glucuronique, avec des niveaux plus bas de MBP non-conjugué, de divers produits d'oxydation du MBP et un peu de l'acide phtalique libre (**Foster et al., 1982; Kawano, 1980; Tanaka et al., 1978; Williams & Blanchfield, 1975**).

Les études *in vitro*, indiquent qu'un métabolite de DBP, le MBP est probablement la forme principale absorbée par l'intestin (**Takahashi & Tanaka, 1989**). Le MBP formé dans le tractus gastro-intestinal, est rapidement absorbé par le système circulatoire, puis il sera largement distribué dans le corps, c'est un métabolite qui ne bio-accumule pas dans les tissues (**Fennell et al., 2004; Saillenfait et al., 1998; NIEHS, 1994, 1995; Tanaka et al., 1978; Williams & Blanchfield, 1975**).



**Figure 2 :** Schéma métabolique du DBP (Albro & Moore 1974; Foster *et al.*, 1982; Tanaka *et al.*, 1978)

### 3.4. Elimination

La voie d'élimination principale de DBP est urinaire (88%). Les voies secondaires sont les fèces dont la clairance est rapide. Le principal métabolite urinaire identifié dans les urines est le MBP-glucoronide (**Foster et al., 1982**).

Plus d'un tiers du DBP absorbé, est excrété par la bile pour être réabsorbé au niveau intestinal, entrant ainsi dans un cycle entérohépatique qui explique sa faible excrétion fécale (moins de 10%). Il faut noter que plus de 90% d'une dose administrée oralement est éliminé en 24 à 48 h par voie urinaire (**Tanaka et al., 1978**).

Chez le rat, la contamination transdermique du DBP pendant 7 jours, montre que 60% de la dose administrée ont été retrouvés dans les urines et seulement 12% dans les fèces (**INRS, 2003**).

## 4. Toxicité générale du DBP

### 4.1. Toxicité aiguë

La DL<sub>50</sub> du DBP administré par voie orale, est entre 4,8 et 5,3 g/kg chez le rat. Chez les lapins, la DL<sub>50</sub> par voie cutanée, est supérieure à 20 g/kg (**INRS, 2003**). Par voie sous-cutanée chez la souris, la DL<sub>50</sub> est égale à 20,8 g/kg (**RETCS, 1993**). Cependant par inhalation, la CL<sub>50</sub> chez le rat, est supérieure à 15,68 mg/l après 4 heures d'exposition et égale à 25 mg/l chez la souris après 2 heure d'exposition (**Voronin, 1975 ; Greenough et al., 1981**).

Chez l'Homme, plusieurs cas d'intoxication aux produits contenant du DBP ont été décrits, avec différents symptômes selon la voie de pénétration. On retrouve majoritairement: irritation des muqueuses respiratoires, irritation oculaire (larmolements, conjonctivite), irritation cutanée (érythème). Par la voie orale, le DBP induit: troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhée), atteinte rénale (hématurie, leucocyturie et albuminurie), (urine noire/jaune avec sédiments) (**INRS, 2003**).

Chez le rat, L'exposition aiguë par le DBP induit une diminution générale de l'activité, se traduisant par une somnolence, des difficultés respiratoires, ainsi qu'une perte de coordination des mouvements. Le décès des animaux est précédé par une diminution de la température corporelle et survient dans les trois jours qui suivent l'administration. En plus, l'examen anatomo-pathologique révèle des foyers nécrotiques au niveau hépatique (**INRS, 2003**).

#### **4.3. Toxicité subaiguë**

Chez les rats, l'administration de 250 mg/kg/j du DBP par la voie orale avec une dose considéré comme la plus petite dose testée après 15 jours de traitement, a été provoqué des lésions dégénératives au niveau de la lignée spermatique. De plus, a été décrite une nécrose de 5% des tubes séminifères dues apparemment à des modifications hormonales (**Srivastava et al., 1990**).

Dans une étude faite chez la même espèce mais cette fois par inhalation de la dose dite le NOAEL (509 ppm), et pendant une période de 28 jours, il s'est avéré que les effets engendrés sont moindres, puisque a été observé sauf une légère irritation du tractus respiratoire (**Gamer et al., 2000**).

#### **4.4. Toxicité chronique**

Chez le rat et la souris, l'ingestion d'une alimentation contenant 2% du DBP pendant 90 jours provoque une altération des fonctions hépatiques, ainsi qu'une prolifération de peroxysomes. Cette quantité du DBP ingéré a entraîné également une anémie. Aussi, une baisse du poids corporel accompagnée d'une augmentation de la masse des reins (**INRS, 2003**).

Chez les rats, la dose 152 mg/kg/j du DBP représente la dose, sans effet toxique (**NOAL**). L'administration répétée de cette dose par gavage à long terme provoque des effets

sur la reproduction (lésions testiculaires) (INRS, 2003). Cependant une étude de toxicité chez le rat menait pendant 28 jours (1,18 à 509 mg/m<sup>3</sup>) par inhalation, a montré que cette dose a entraîné des modifications histologiques mais sans signes d'inflammation au niveau pulmonaire (INRS, 2003).

Chez les humains, l'administration répétée d'une dose faible de DBP pendant une longue durée, provoque une forte incidence de neuropathie. Elle est soit centrale (narcose), soit périphérique (polynévrite, sensitivomotrice) ou autonome (hypertension artérielle hyperhydrose palmo-plantaire pour des niveaux d'exposition important. L'examen sanguin a révélé une légère pancytopenie (réduction du nombre de globules rouges et blancs, ainsi que du nombre de plaquettes) avec réticulocytose modérée et accélération de la vitesse de la sédimentation (INRS, 2003).

## **5. Les principaux effets toxiques du DBP**

Les principaux effets du DBP qui ont été rapportés dans plusieurs études expérimentales réalisées chez différentes espèces animales (rat, hamster, souris, lapin...), et chez les deux espèces (mâle et femelle). On cite, l'atrophie testiculaire, l'atteinte hépatique, une augmentation de la masse des reins, la baisse de la fertilité, une diminution du poids foetal, une activité anti-androgène ainsi que des effets tératogènes (Blount *et al.*, 2000 ; IPCS, 1997).

### **5.1. Effets du DBP sur le foie**

Le foie a été identifié comme l'un des organes cible de l'effet délétère du DBP. Chez les rongeurs adultes, l'effet le plus évident d'une contamination chronique au DBP par voie orale se traduit par une prolifération des péroxysomes hépatiques (Lake *et al.*, 1975; Reddy *et al.*, 1976). Il s'agit de l'effet néfaste le plus sensible qu'il soit. Il a été reconnu que cette

sensibilité hépatique ne concerne pas l'Homme, mais elle est spécifique seulement au rongeur (INRS, 2003).

Cette réponse hépatique bénigne a été observée chez les rats et les souris qui ont été exposés par voie orale au DBP pour des durées aiguës (2- 4 jours) ou intermédiaires (15-20 jours). Parmi ces effets on note, une augmentation du poids du foie, celles aussi de l'activité des enzymes microsomales. Aussi l'inhibition de la respiration mitochondriale (phénomène d'hypoxie cytopathique), une nécrose du foie et la prolifération des peroxysomes (INRS, 2003). La plus basse dose à ces effets est observée à 348 mg/kg/j (ATSDR, 2001).

## **5.2. Effets du DBP sur la thyroïde et le système immunitaire**

Outre le foie, cible privilégiée du DBP, ce composé est également connu pour son incidence néfaste sur d'autres fonctions biologiques de l'organisme. Il n'existe toutefois qu'une faible documentation relative à ces effets.

Au niveau de la thyroïde, deux études montrent que l'exposition de rats adultes au DBP induit une diminution de la production d'hormones thyroïdiennes T3 et T4 (Hinton *et al.*, 1986; O'Connor *et al.*, 2002).

Chez l'Homme, seules quelques études épidémiologiques mettent en évidence une corrélation entre des taux de DBP élevé et un dysfonctionnement de la fonction thyroïdienne. Huang *et al.*, (2007) ont montré une corrélation entre les taux de MBP chez la femme enceinte et une diminution de l'hormone T4 libre et totale.

Le DBP est également suspecté d'agir sur le système immunitaire. En effet, dans un modèle de souris favorables aux réactions allergiques, le traitement au DBP de femelles gestantes entraîne sur la descendance mâle une accélération de la différenciation des cellules impliquées dans la réaction allergique (Koike *et al.*, 2009). Une seconde étude montre que l'effet adjuvant du DBP chez la souris adulte est strictement restreint à la surproduction

d'anticorps de types IgG (impliqués dans la cytotoxicité des anticorps) (Larsen & Nielsen, 2008).

### 5.3. Effets du DBP sur la reproduction

#### 5.3.1. Chez la femme

Il a été démontré par les chercheurs que l'exposition au DBP (500 mg/kg/jour) *in utero* chez les rats provoquerait une augmentation de la mort des fœtus accompagnée de cas d'avortements spontanés (Tomita *et al.*, 1986; Gray *et al.*, 2006; Howdeshell *et al.*, 2008). On observe également un allongement des cycles d'œstrus des rattes de 20 jpp (jours post partum) ainsi que l'apparition d'ovaires polykystiques, l'anovulation et une infertilité des animaux. Ces symptômes s'accompagnent d'une réduction des taux plasmatiques d'œstradiol et de progestérone (Davis *et al.*, 1994; Lovekamp-Swan & Davis, 2003; Svechnikova *et al.*, 2007).

#### 5.3.2. Chez l'homme

En ce qui concerne la fonction de la reproduction masculine, il a été démontré dans plusieurs recherches notamment dans les pays industrialisés que l'exposition au DBP chez l'homme entraîne des effets néfastes sur la fonction de la reproduction. Parmi ces effets critiques les plus fréquents sont les altérations des testicules et de la prostate, ainsi que d'une réduction du nombre de spermatozoïdes (Henley *et al.*, 2004). Des études ont révélé qu'au niveau de la gonade, le DBP administré (500 mg/kg/jour) provoque une diminution du poids des testicules et une baisse de la qualité et quantité du sperme, corrélée à une baisse de la fertilité (Mylchreest *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2003; Mahood *et al.*, 2005; Foster, 2006; Wilson *et al.*, 2007; Alam *et al.*, 2010) .

### 5.3.2.1. Altération de la fonction stéroïdienne

Le DBP qui est classé comme toxique pour la fonction de la reproduction, est également classé en tant que perturbateur endocrinien chez les rongeurs, de par l'altération de la synthèse des stéroïdes qu'il entraîne. En effet, l'exposition de rattes gestantes au DBP (pour des doses de 100 à 1000 mg/kg/jour) entraîne une diminution de la production de la testostérone en fin de la vie fœtale. Ces observations ont été réalisées aussi bien pour une exposition au diester (Akingbemi *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2003; Lehmann *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004; Borch *et al.*, 2006; Culty *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Alam *et al.*, 2010) que pour une exposition au métabolite monoesterique principal (Shono *et al.*, 2000).

Il est intéressant de noter que Thomson *et al.*, (2004) ont montré qu'en fin de vie fœtale, 48h après arrêt du traitement par gavage au DBP, les fœtus mâles présentaient un début de récupération du taux de testostérone. Ceci met en avant la potentielle de réversibilité de l'effet du DBP sur la fonction stéroïdiennes (Xiao-feng *et al.*, 2009).

En parallèle de la diminution de production de testostérone, l'exposition au DBP (dès 500 mg/kg/jour) entraîne chez le rat un phénomène d'agrégation des cellules *de Leydig* (Parks *et al.*, 2000; Mahood *et al.*, 2005; Scarano *et al.*, 2010). Cette agrégation peut être accompagnée d'une diminution du nombre total de cellules *de Leydig* (Lin *et al.*, 2008) ainsi que leurs hyperplasie (Fisher *et al.*, 2003; Borch *et al.*, 2006; Culty, 2009).

### 5.3.2.2. Altération de la fonction gamétogénèse

Le DBP agit sur les cellules *de Sertoli* qui ont le rôle d'être un support du développement des cellules germinales, provoquant une diminution du nombre de ces dernières (Scott *et al.*, 2007) ainsi que leur prolifération (Auharek *et al.*, 2010). Ces données peuvent expliquer la réduction du nombre de cellules germinales observée durant la vie

foetale, comme à l'âge adulte. En effet, le traitement *in utero* de rats aux phtalates entraîne une diminution du nombre de cellules germinales à la fin de cette période (**Ferrara et al., 2006**).

De plus, plusieurs études expérimentales ont mis en évidence l'impact du DBP sur l'interaction entre les cellules *de Sertoli* et les cellules germinales. D'une part, le DBP provoque une altération de filaments de Vimentine qui représente la communication intercellulaire (entre ces cellules). D'autre part, il agit également sur la protéine NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) et les Cadhérines, provoquant une modification au niveau de leur localisation reflétant une altération de la structure des cordons séminifères (**Kleyменова et al., 2005**).

Enfin, d'autres études *in utero* ont mis en évidence chez le rat l'apparition de gonocytes plurinucléés après le traitement au DiBP ou DBP chez le rat (**Kleyменова et al., 2005; Borch et al., 2006**). Ce phénomène particulier semble être transitoire, puisqu'à l'heure actuelle la présence de ces cellules n'a pas été démontrée à l'âge adulte (**Ferrara et al., 2006; Boekelheide et al., 2009**).

#### 5.4. Effet du DBP sur le développement

Bien que le DBP puisse agir directement chez l'individu adulte sur la fonction de la reproduction, il semblerait que ce composé agit plutôt en altérant le développement de cette fonction au cours de la vie foetale (**Borch et al., 2004**). Les effets les plus importants sur le développement ont été observés au niveau de l'appareil reproducteur mâle. Parmi ces effets, notons: la diminution de la distance anogénitale, une cryptorchidie, hypospadias, une hypoplasie ou agénésie épидидymaire, une hypospermie, une dysgénésie testiculaire focale et une persistance mamelonaire (**Saillenfait et al., 2009 ; Saillenfait et al., 2011**).

**Swan et al., (2005)** ont démontré chez les humains, l'existence d'une relation significative entre la concentration du DBP dans les urines des mères pendant la grossesse et les anomalies de l'appareil génital mâles observés chez les nouveau-nés (diminution de la distance anogénitale, trouble de la migration testiculaire, hypoplasie scrotale).

Selon le plan histologique et fonctionnel, l'exposition *In utero* au DBP allant de 100 à 1000 mg/kg/jour à la fin de la vie fœtale et début de vie post-natale, entraîne des lésions testiculaires importantes aussi (troubles de la migration, lésions dégénératives des tubes séminifères, diminution des spermatoocytes, hyperplasie des cellules interstitielles, voire adénomes). D'autres lésions ont été également énumérées comme celles des lésions de l'épididyme, des vésicules séminales et de prostate (**Borch et al., 2004; Tyl et al., 2004; Borch et al., 2005; Christiansen et al., 2010; Saillenfait et al., 2011**).

De plus, l'exposition de rattes gestantes au DBP (500 mg/kg/jour) entraîne l'apparition de zones de dysgénésie des cordons séminifères (**Fisher et al., 2003**), avec des cordons incomplètement formés comprenant même des zones locales de cellules *de Leydig* enchâssées au sein de ces cordons (**Mahood et al., 2005**). En plus, L'exposition *in utero* au DBP entraîne une diminution de la production de testostérone ainsi qu'une altération histologique dans la répartition des cellules *de Leydig* (**Borch et al., 2006**).

## 5.5. Génotoxicité

Récemment, plusieurs travaux ont été menés sur la capacité des phtalates à altérer l'expression génique. l'étude de **Gwinn et al., (2007)** a montré que le traitement par le DBP de quatre souches de cellules épithéliales mammaires humaines normales a induit après 5 à 10 heures, une altération des gènes pendant leurs expression. Cette altération peut provoquer une toxicité sur : la reproduction, la transduction du signal, la réponse immunitaire, la prolifération cellulaire, l'organogénèse, et l'oncogène.

## 5.6. Effet Cancérigène

Il a déjà été suggéré, que les phtalates ont un impact sur la tumorigénèse et par conséquent induisant le cancer (**Kleinsasser *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 1999**). Par contre, d'autres études ont indiqué qu'il n'y a pas eu de mise en évidence d'un risque du cancer lié à l'exposition du DBP.

De nombreuses études ont montré chez les rongeurs que, le DBP était capable d'induire la prolifération des peroxyosomes. Or, il est actuellement admis que ce mécanisme est responsable chez les rongeurs, d'effets cancérigènes hépatiques observés dans les études de longitudinale. Des investigations récentes ont apporté la preuve que, les substances responsables de la prolifération de peroxyosomes exerçaient leurs effets via l'activation du récepteur PPAR $\alpha$  et que le gène responsable de cette activation ne s'exprimait que chez les rongeurs. En conséquence, les effets cancérigènes observés sont spécifique pour les rongeurs, et ils sont considérés comme non extrapolables à l'homme (**INRS, 2003**).

## 8. Mécanismes d'action du DBP

Selon le plan endocrinien, le DBP est considéré comme un perturbateur endocrinien de type œstrogénique car, il avait été trouvé lors d'études cellulaires *in vitro* qu'il avait une faible action agoniste des récepteurs ostrogéniques. Cependant, certaines études évoquaient le fait que les phtalates pouvaient interagir avec les récepteurs aux androgènes (**Jobling *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1997**). Ce caractère androgénique a été mentionné au vu des effets observés chez le rat et la souris mâle sur le développement et la fonction de l'appareil reproducteur (**Mylchreest *et al.*, 1999**). Cependant, le mécanisme d'action anti-androgénique du DBP n'est pas lié au blocage des récepteurs androgéniques mais à une diminution importante de la sécrétion de testostérone (65-70% dans le testicule) (**Mylchreest, 2002**).

Selon le plan cytologique, il est clair que le DBP provoque une atteinte au niveau des cellules *de Sertoli*. Car, cette atteinte altère la sécrétion paracrines de ces cellules, dont leurs rôles est de réguler la différenciation et la fonction des cellules de *Leydig*, qui ne sont pas elles, régulées par la LH pendant la période fœtale (**Ward et al., 1998**). Au niveau de l'hypophyse, la FSH peut agir avec le DBP, elle interfère avec son récepteur qui situe sur les cellules *de Sertoli* (**NTP, 2000**).

chez l'individus adulte, les cellules *de Sertoli* jouent essentiellement un rôle d'assistance à la spermatogenèse qui se présente par : différenciation, croissance et fonctions des cellules germinales (**Hoeben et al., 1994**). Lorsque ces cellules sont touchées par la toxicité du DBP, il s'engendre des malformations des spermatozoïdes (la prolifération de gonocytes multinuclées). Il est connu que les cellules *de Sertoli*, jouent un rôle important pendant la vie fœtale, par la sécrétion de facteurs impliqués dans la régression müllérienne (hormone antimüllérienne), la morphogenèse des tubes séminifères et la différenciation des gonocytes (**De Rooij et al., 1998**). L'étude de **Imagima et al., (1997)** suggèrent que le MBP, sous sa forme non conjuguée, principal métabolite du DBP, soit l'agent responsable des effets testiculaires toxiques (**Gray et al., 1982**).

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## II-MATERIELS ET METHODES

### 1. Matériels

#### 1.1. Matériel biologique

Cette étude examine l'effet d'un puissant produit chimique sur la fonction de reproduction des lapins. Pour ce faire, 24 lapins mâles, adultes, domestiques de l'espèce *Oryctolagus cuniculus* ont été ramenés de la région d'Annaba et mis en expérimentation. Les lapins étaient âgés entre 06 - 09 mois. Leur poids corporel moyen est de  $1800 \pm 130$  g.

#### 1.2. Condition d'élevage

L'élevage des animaux a été réalisé dans l'Animalerie du département de Biologie Animal de la faculté des Sciences d'Annaba. Les lapins ont été maintenus à leur arrivé pendant toute la période de l'élevage (15 jours) et du traitement (30 jours) sous des conditions naturelles (température 18° - 25°C, humidité 30% - 70% et photopériode naturelle).

Au début de l'expérimentation, les animaux ont été répartis en 04 groupes de 06 lapins/groupe (n=6). Ils ont été placés dans des cages métalliques de (50 x 60 x 53 cm<sup>3</sup>), avec mangeoires et abreuvoirs.

La nourriture distribuée aux lapins, durant toute la période d'expérimentation (2 fois par jour) est composée, d'un mélange de salades, de carottes et du pain rassasié. L'eau est fourni *ad libitum* aux animaux et renouvelée quotidiennement.

### 1.3. Classification de l'animal

Le Tableau N°2 nous donne la classification générale du lapin domestique *Oryctolagus cuniculus*.

**Tableau 2 : Classification de l'animal**

<i>Type de la classification</i>	<i>Lapin</i>
<b>Règne</b>	Animal
<b>Embranchement</b>	Vertébrés
<b>Classe</b>	Mammifères
<b>Super ordre</b>	Glires
<b>Ordre</b>	Lagomorphe
<b>Famille</b>	Léporidés
<b>Genre</b>	<i>Oryctolagus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Oryctolagus Cuniculus</i>

## 2. Méthodologie

### 2.1. Traitement (la solution du dosage)

La solution du dosage a été préparé par dilution du DBP pure 99.9%, (CAS : 84-74-2, PM : 278,345, densité : 1.047) dans l'eau distillé afin d'obtenir 3 doses de 250, 500 et 750 mg/kg/j.

Le volume de l'administration orale est ajusté à 5 ml/1000 g. pc.

L'administration du DBP se fait par gavage à l'aide d'une sonde gastrique durant 4 semaines successives et une fois par jour.

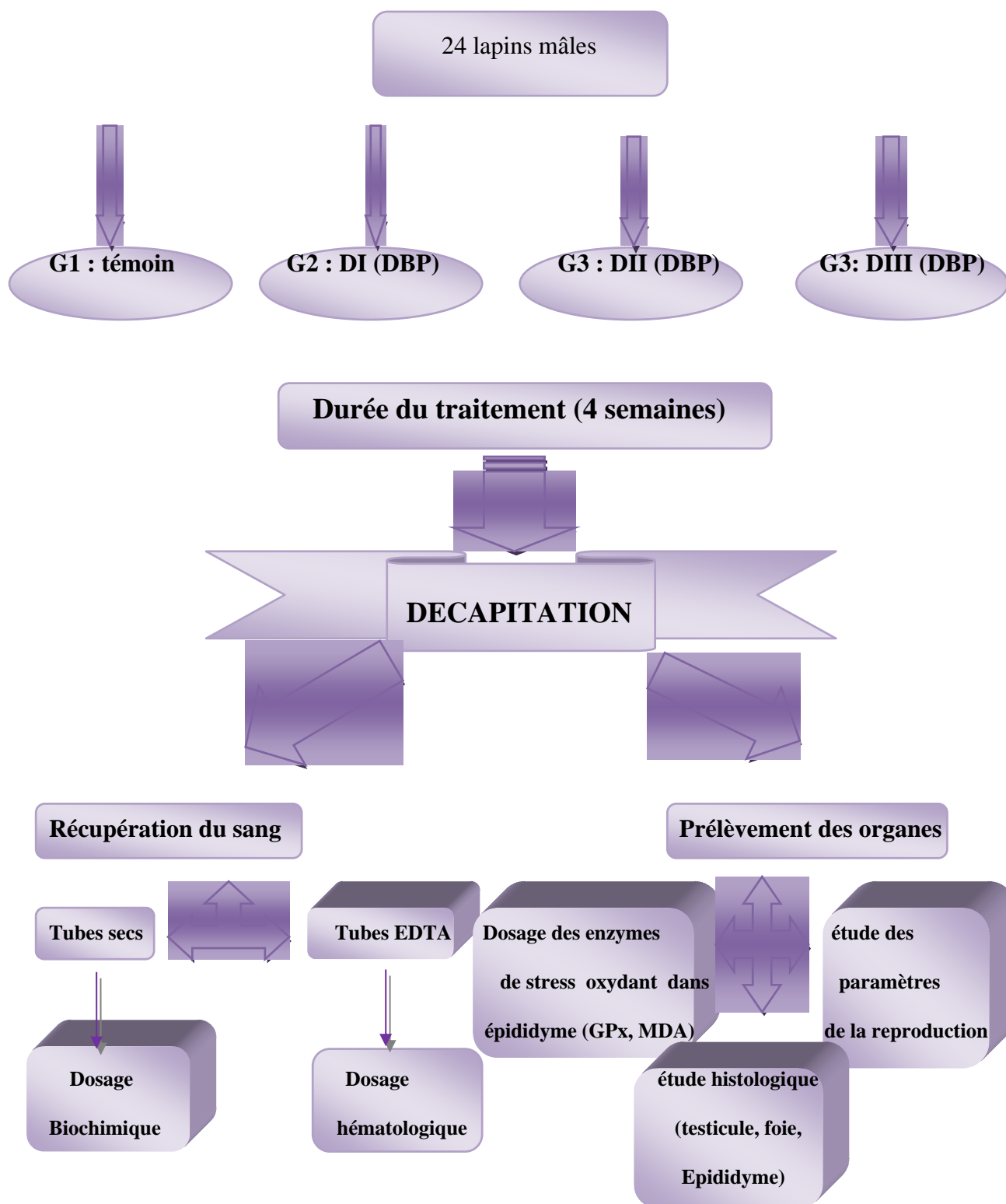
## **2.2. Protocole expérimental**

L'expérimentation consiste à administrer aux lapins trois doses croissantes du DBP à raison de 250, 500 et 750 mg/kg/j. Les 24 lapins ont été réparties en quatre groupes avec (n=6), selon :

- groupe témoin (non traité) (**T**).
- groupe traité au 250 mg/kg/j de DBP (**DI**).
- groupe traité au 500 mg/kg/j de DBP (**DII**).
- groupe traité au 750 mg/kg/j de DBP (**DIII**).

La pesée des animaux s'est effectué chaque jour, jusqu'à la fin de l'expérimentation.

La Figure N°3 nous résume le protocole expérimental réalisé au cours de ce travail.



**Figure 3:** Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

### 3. Préparation des prélèvements

#### 3.1. Prélèvement sanguin

Après 4 semaines du début du traitement, les 4 groupes ont été sacrifiés par décapitation.

Le sang est alors recueilli immédiatement dans deux tubes :

- ✓ Soit à EDTA, pour le dosage des paramètres hématologiques (nombres de globules blanc et rouges, hématocrite, hémoglobine, plaquettes et les constantes hématologiques : VGM, CCMH et CGMH).

Ces dernières ont été analysées par un Automate *ABACUS*.

- ✓ Soit Sec. Les tubes ont été centrifugés à 5000 tours/min pendant 15 minutes. Le sérum obtenu est divisé en 3 fractions dans des tubes Eppendorf puis conservé à -20°C jusqu'au moment du dosage biochimique.

#### 3.2. Prélèvement des organes

Après la dissection des animaux, certains organes ont été récupérés dont les testicules avec leurs épидидymes, le foie et les reins. Ces deux derniers sont prélevés et débarrassés de leurs tissus adipeux, rincés dans une solution de chlorure de sodium à 0,9 % puis pesés à l'aide d'une balance de précision. A la fin, le poids absolu des organes est calculé.

- **Conservation des organes**

Pour cela, on a procédé comme suit :

- Un fragment des trois, à savoir celui du foie, du testicule et de l'épididyme de chaque animale a été conservé dans une solution de Bouin alcoolique, afin de réaliser des coupes histologiques.
- Sauf le 2<sup>ème</sup> fragment du l'épididyme de chaque animale est maintenu à -20°C pour le dosage des enzymes de stress oxydant (MDA et GP<sub>x</sub>).

#### 4. Etudes de quelques paramètres de la reproduction (OMS, 1993)

Après la dissection de l'animal, testicules et épидидymes sont prélevés. Un liquide blanc sort de la queue de l'épididyme couper. Une goutte du liquide (1µl) du sperme est ajoutée dans 49µl d'eau physiologique (NaCl) à 0.9% (la dilution du sperme). Cette solution obtenue est utilisée pour étudier quelques paramètres de la reproduction:

- Concentration
- Vitesse
- Mobilité
- Vitalité

##### 4.1. Concentration des spermatozoïdes

-La concentration des spermatozoïdes est mesurée en utilisant une cellule de *Malassez*.

-Une goutte du sperme dilué est introduite dans la cellule de *Malassez* puis recouverte par une lamelle.

-Cette mesure repose sur le comptage des spermatozoïdes dans 05 cellules à un grossissement X400.

- La concentration des spermatozoïdes est calculée selon la méthode suivante :

$$\text{Concentration (SPZ. } 10^6/\text{ml)} = \mathbf{D \times V \times n / N}$$

-**D** : Coefficient de dilution (50)

-**V** : Volume de la cellule de *Malassez*

-**n** : Le nombre de spermatozoïdes comptés dans 05 cellules

-**N** : Le nombre de petites cellules

#### 4.2. Mobilité des spermatozoïdes

- Une goutte du sperme diluée est déposée sur une lame, puis recouverte par une lamelle.
- La préparation est examinée sous microscope optique à un grossissement X400.
- Le champ d'observation est divisé en 03 champs pour classer 100 spermatozoïdes, après on calcule le pourcentage des spermatozoïdes mobiles.

#### 4.3. Vitesse des spermatozoïdes

- Une goutte du sperme dilué est déposée sur une lame de *Malassez* à l'aide d'une micropipette puis recouverte par une lamelle.
- La préparation est examinée sous microscope optique à un grossissement X400.
- L'examen peut cependant se faire dans des conditions à la température ambiante du laboratoire.
- La lame de *Malassez* contient des lignes horizontales (0.5 µm entre deux lignes).
- Le principe de cette étude est de calculer le temps de déplacement d'un spermatozoïde entre 02 lignes à l'aide d'un chronomètre.
- La vitesse des spermatozoïdes est calculée par l'application de la relation suivante :

$$V = d / t$$

-**V** : Vitesse de spermatozoïdes (µm/sec)

-**d** : La distance entre 2 lignes (0.5 µm)

-**t** : Le temps de déplacement (sec)

-on avait calculé la vitesse de 10 spermatozoïdes, puis on calcule la vitesse moyenne.

#### **4.4. Vitalité des spermatozoïdes**

##### **4.4.1. Test de coloration vitale des spermatozoïdes**

###### **❖ Méthode**

- Il s'agit de mélanger une goutte du sperme dilué avec une goutte de solution d'éosine à 1% sur une lame puis recouvrir la préparation avec une lamelle.
- Après une à deux minutes, la préparation est observée au grossissement (X400).
- La vitalité des spermatozoïdes est déterminé par la numération des cellules sexuelles colorées et incolores dans 3 champs d'observation. Par la suite le pourcentage de chaque catégorie (spermatozoïdes colorés et incolores) est calculé.

##### **4.4.2. Test de gonflement hypo osmotique des spermatozoïdes**

Ce test est réalisé pour étudier les modifications morphologiques des spermatozoïdes exposées à un stress hypo osmotique. Pour cela, 100 spermatozoïdes sont comptés au microscope.

###### **❖ Solution utilisée**

- Il faut dissoudre 0,367g de citrate de sodium ( $\text{Na}_3 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7, 2\text{H}_2\text{O}$ ) et 0.675g de fructose dans 50 ml d'eau distillée (conserver à  $-20^\circ\text{C}$ )
- Après décongélation, la solution est bien mélanger avant usage.

###### **❖ Méthode**

- Pendant 5 minutes environ, 1 ml de la solution est réchauffer à  $37^\circ\text{C}$ , puis placé dans un tube Eppendorf fermé.

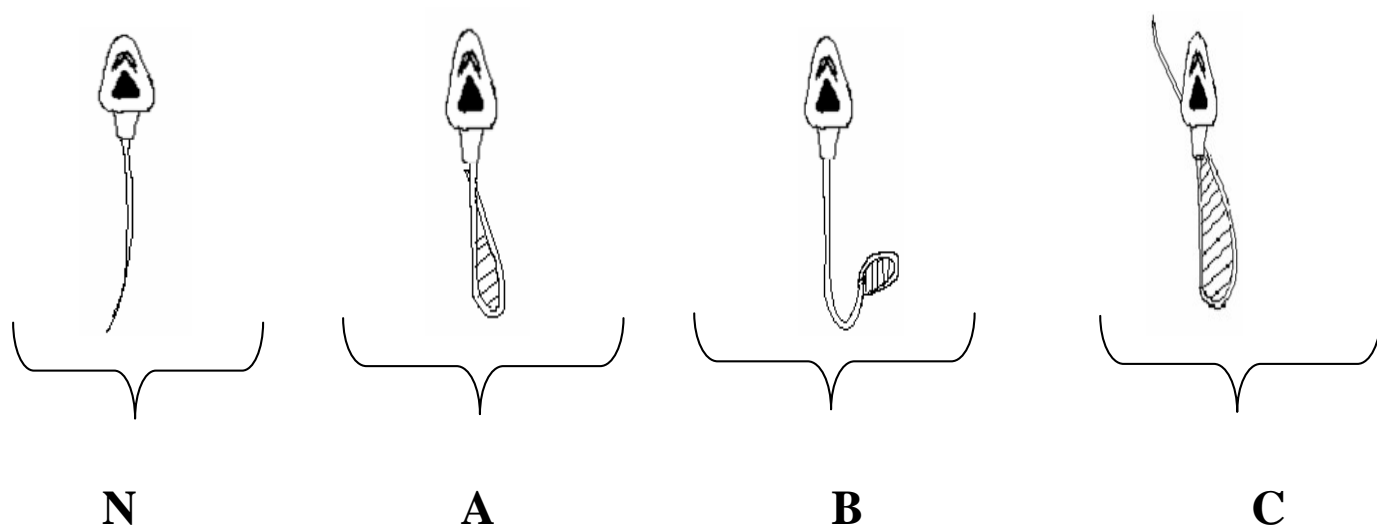
-A la solution, il faut ajouter 0.1 ml de la solution et mélanger le tout doucement à l'aide d'une pipette.

- Laisser incuber à 37°C pendant 30 minutes.

- Les spermatozoïdes sont observés sous microscope optique avec un grossissement (x400).

- A l'observation, ce sont les spermatozoïdes gonflés qui présentent des modifications de leurs flagelles (Fig. 4).

- En dernier, le pourcentage des spermatozoïdes présentant des modifications du flagelle sur un total de 100 spermatozoïdes comptés est calculé.



(N) : Spermatozoïde normal

(A) : Modification faible du flagelle

(B) : Modification importante au niveau du flagelle

(C) : Modification importante au niveau du flagelle et la pièce intermédiaire

**Figure 4:** Présentation schématique des modifications morphologiques caractéristiques des spermatozoïdes exposés à un stress hypo-osmotique.

## 5. Dosage hormonal

### 5.1. Dosage de la testostérone (Litwak, 1992). Selon la fiche technique VIDAS.

#### - Principe :

Le test immuno-enzymatique sur phase solide (ELISA) est basé sur le principe de compétition. La quantité inconnue d'antigènes présents dans l'échantillon et une quantité fixe d'antigènes conjugués à une enzyme entrent en compétition pour les sites de fixation des anticorps coatés dans les puits. Après incubation, les puits sont lavés pour arrêter la réaction de compétition. L'intensité de la couleur développée suivant la réaction substrat est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène présente dans l'échantillon. Les résultats des échantillons peuvent être déterminés directement à partir de courbe étalon.

#### -Matériel fourni :

Quantité	Symbole	Composant
1 x 12 x 8	MTP	<b>Microplaque</b> Barrettes sécables. Recouvert de anticorps de souris anti-testostérone (monoclonal).
1 x 25 ml	ENZCONJ	<b>Conjugué Enzymatique</b> Prêt(e) à l'emploi. Contient: Testostérone conjuguée à HRP, stabilisateurs.
1 x 7 x 1 ml	CAL A - G	<b>Etalon A-G</b> 0; 0.2; 0.5; 1.0; 2.0; 6.0; 16 ng/ml Prêt(e) à l'emploi. Contient: Testostérone, Sérum humain, stabilisateurs.
2 x 1 ml	CONTROL 1 + 2	<b>Contrôle 1 + 2</b> Prêt(e) à l'emploi. Contient: Testostérone, Sérum humain, stabilisateurs.
1 x 12 ml	TMB SUBS	<b>Solution Substrat TMB</b> Prêt(e) à l'emploi. Contient: TMB, Tampon, stabilisateurs.
1 x 12 ml	TMB STOP	<b>Solution d'Arrêt TMB</b> Prêt(e) à l'emploi. 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .
1 x 100 ml	WASHBUF CONC	<b>Tampon de Lavage</b> Concentré (10x)
2 x	FOIL	<b>Feuille adhésive</b>

**-Matériel nécessite :**

1. Pipettes (Multipette Eppendorf ou matériel similaire, CV < 3%) Volumes: 25; 100; 200 µL)
2. Vortex.
3. Micropipette à 8-canaux avec réservoirs pour réactifs.
4. Bouteille pour lavage, système automatique ou semi-automatique pour le lavage de microplaque.
5. Lecteur de microplaque capable de lire l'absorbance à 450 nm (longueur d'onde de référence 600-650 nm).
6. Eau distillée ou déionisée.
7. Papier absorbant, embouts de pipette et chronomètre

**-procédure du test :**

<b>1</b>	Pipeter 25 µL de chaque Etalon, Contrôle et échantillon dans les puits respectifs de la Microplaque.
<b>2</b>	Pipeter 200 µL de Conjugué Enzymatique dans chaque puits.
<b>3</b>	Couvrir la plaque avec une feuille adhésive. Bien mélanger pendant 10 secondes.
<b>4</b>	Incuber 60 min à TA (18-25°C).
<b>5</b>	Retirer la feuille adhésive. Jeter la solution d'incubation. Laver la plaque 3 x avec 300 µL de Tampon de Lavage dilué. Egoutter l'excès de solution en frappant la plaque retournée sur du papier absorbant.
<b>6</b>	Pipeter 100 µL de Solution Substrat TMB dans chaque puits.
<b>7</b>	Incuber 15 min à TA (18-25°C).
<b>8</b>	Arrêter la réaction substrat en ajoutant 100 µL de Solution d'Arrêt TMB dans chaque puits. Mélanger rapidement le contenu en agitant la plaque. La couleur vire du bleu au jaune.
<b>9</b>	Mesurer la densité optique avec un photomètre à 450 nm (longueur d'onde de référence: 600-650 nm) dans les 10 min suivant l'ajout de la Solution d'Arrêt.

**-Calcul des résultats :**

Les densités optiques (DO) des étalons (axe y, linéaire) sont reportées en fonction de leurs concentrations (axe x, logarithmique) soit sur papier graphique semi-logarithmique soit en utilisant une méthode automatisée. Une bonne analyse est obtenue avec les méthodes cubic spline, Logistics 4 Paramètres ou Logit-Log. Pour le calcul de la courbe étalon, appliquer chaque signal des étalons (une valeur apparemment fautive d'un double dosage peut ne pas être prise en compte et peut être remplacée par une valeur plus plausible).

La concentration des échantillons peut être lue à partir de courbe étalon. Les échantillons montrant une concentration supérieure à celle de l'étalon le plus concentré doivent être dilués de la façon décrite dans les préparations préalable au test et testés de nouveau.

-Les résultats des échantillons ayant été pré-dilués doivent être multipliés par le facteur de dilution appliqué.

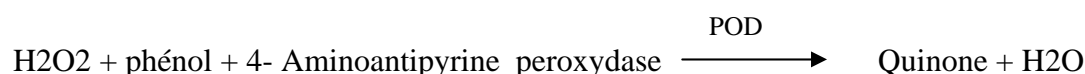
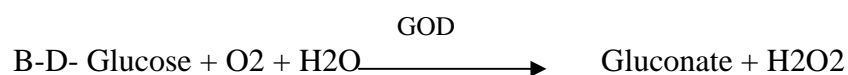
Conversion: Testostérone (ng/ml) x 3.47 = nmol/L

## 6. Dosage des paramètres biochimiques

**6.1. Dosage plasmatique du glucose (Kaplan, 1984).** Selon la fiche technique Spinreact.

**-Principe :**

Le glucose subit des réactions couplées décrites ci-dessous pour donner un complexe coloré, qui peut être mesuré à la spectrométrie.



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon.

**-Echantillon:** Sérum

**-Réactifs utilisés :**

<i>Les réactifs</i>	<i>Composition</i>	<i>Concentration</i>
<b>R1 tampon</b>	Tris pH 7.4	92 m mol/l
	phénol	0.3 m mol/l
<b>R2 enzymes</b>	Glucose oxydase (GOD)	15000 U/l
	Peroxydase (POD)	1000 U/l
	4- Aminophenazone (4-AP)	0.6 m mol/l
<b>Glucose cal</b>	Etalon de glucose aqueux primaire	100 mg/dl

**Préparation du réactif de travail (RT) :**

- ✓ Dissoudre le contenu de R<sub>2</sub> dans la fiole de R<sub>1</sub>.
- ✓ Mélanger bien doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif de travail est stable 4 mois à 2-8 C°, ou 40 jours à 15-25 C°.

• **Mode opératoire :**

	<i>Blanc</i>	<i>Etalon</i>	<i>Echantillon</i>
<b>RT (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Etalon (µl)</b>	...	1.0	...
<b>Echantillon (µl)</b>	...	...	1.0

-Agiter bien et incuber pendant 5 min à 37° C.

-Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 500 nm et de l'étalon contre le blanc, la couleur est stable après 30 min.

- **Calcule** : la concentration du glucose dans l'échantillon est calculée par la formule suivante :

$$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{(\text{A}) \text{ échantillon}}{(\text{A}) \text{ étalon}} \times 100$$

-La concentration de l'étalon = 100 mg/dl

-Facture de conversion : mg/dl x 0.055 = m mol/l

**6.2. Dosage plasmatique des protéines totales (Burtis *et al.*, 1984).** Selon la fiche technique Spinreact.

**-Principe :**

Les protéines de sérum forment dans un milieu alcalin avec les ions de cuivre, un complexe coloré en bleu, L'intensité de couleur violette est proportionnelle à la quantité des protéines présentées dans l'échantillon.



**-Echantillon** : sérum

**-Réactifs utilisés :**

<i>Les réactifs</i>	<i>Composition</i>	<i>Concentration</i>
<b>Réactif de Biuret</b>	Sodium potassium tartrate	15 mol/l
	Sodium iodique	100 mol/l
	Potassium iodique	5 m mol/l
	Cuivre de sulfate	19 m mol/l
<b>Réactif Etalon</b>	Sérum bovine albumine	7 g/dl

**-Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillon
<b>R (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Etalon (µl)</b>	...	25	...
<b>Echantillon (µl)</b>	...	...	25

-Agiter bien et incuber pendant 5 min à 37°C, ou 10 min à la température de 25°C.

-Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 540 nm et de l'étalon contre le blanc, la couleur est stable après 30 min.

$$\text{Concentration des protéines (g/dl)} = \frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ étalon}} \times 7$$

La concentration de l'étalon = 7 (g/dl)

**6.3. Dosage d'albumine (Drupt, 1974).** Selon la fiche technique Elitech.

**-Principe :**

A pH 4.20, le vert de bromocrésol se fixe sélectivement sur l'albumine en donnant une coloration bleue.



**-Echantillon :** sérum

**-Réactifs utilisés :**

Les réactifs	Composition	Concentration
<b>Réactif</b>	Tampon succinate, pH 4.20	87 m mol/l 0.2 m
	Vert de bromocrésol	mol/l 7.35 m mol/l
	Brij 35	
<b>Etalon</b>	Albumine bovine	5 g/dl

**-Mode opératoire :**

	<i>Blanc</i>	<i>Étalon</i>	<i>Echantillon</i>
<b>Réactif (ml)</b>	310	310	310
<b>Eau distillée (µl)</b>	2	...	...
<b>Standard</b>	...	2	...
<b>Echantillon (µl)</b>	...	...	2

-Mélanger et lire l'absorbance (A) après 25 secondes d'incubation, à 660 nm

**-Calcul :**

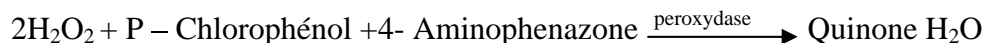
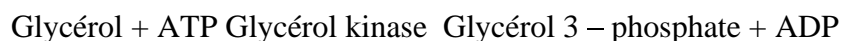
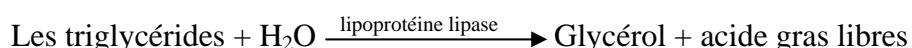
$$\text{Albumine (g/dl)} = \frac{(\text{A}) \text{ échantillon}}{(\text{A}) \text{ étalon}} \times 5$$

- La concentration de l'étalon = 5 g/dl

**6.4. Dosage des triglycérides (Kaplan *et al.*, 1984).** Selon la fiche technique Spinreact.

**-Principe :**

Les triglycérides présents dans l'échantillon forment un complexe coloré selon la réaction suivante :



-L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon.

**-Echantillon :** sérum

**-Réactifs utilisés :**

<i>Les réactifs</i>	<i>Composition</i>	<i>Concentration</i>
<b>R1 tampon</b>	GOOD PH 7.5	50 m mol/l
	P-Chlorophénol	2 m mol/l
<b>R2 enzymes</b>	Lipoprotéine lipase	15000 U/l
	Glycérol kinase	500 U /l
	Glycérol 3 – phosphate Peroxydase (POD)	2500 m mol/l
	4-Amin antipyrine (4-AP)	440 U/l m mol/l
	ATP	0.1 m mol/l
<b>Triglycérides cal</b>	Etalon de Triglycérides aqueux primaire	200 mg/dl

**-Préparation de réactif de travail (RT) :**

-Dissoudre le contenu de R2 dans la fiole de R1.

-Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif de travail est stable 6 semaines à 2-8 C° ou une semaine à 15-25 C°.

**-Mode opératoire :**

	<i>Blanc</i>	<i>Etalon</i>	<i>Echantillon</i>
<b>RL (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Etalon (µl)</b>	...	10	...
<b>Echantillon (µl)</b>	...	...	10

-Agiter bien et incuber pendant 5 min à 37°C, ou 10 min à la température de 25°C°.

-Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 505 nm et de l'étalon contre le blanc, la couleur est stable après 30 min.

**-Calcul :**

$$\text{Concentration des triglycérides (mg/dl)} = \frac{(\text{A}) \text{ échantillon}}{(\text{A}) \text{ étalon}} \times 200$$

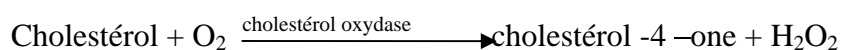
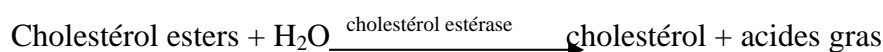
-La concentration de l'étalon = 200 mg/dl

-Facture de conversion : mg/dl x 0.011 = m mol/l

**6.5. Dosage plasmatique du cholestérol (Naito, 1984).** Selon la fiche technique Spinreact.

**-Principe :**

Le cholestérol présent dans l'échantillon forme un complexe coloré selon la réaction suivante :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon.

**Echantillon :** sérum

**Réactifs utilisés :**

Les réactifs	Composition	Concentration
<b>R1 tampon</b>	PIPES PH 6.9	90 m mol/l
	Phénol	26 m mol/l
<b>R2 enzymes</b>	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/l
	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 U /l
	Peroxydase (POD)	1250 m mol/l
	4- Aminophenazone (4- AP)	0.4 m mol/l
<b>Cholestérol cal</b>	Etalon de cholestérol aqueux primaire	200 mg/dl

**-Préparation de réactif de travail (RT) :**

-Dissoudre le contenu de R2 dans la fiole de R1.

-Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif de travail est stable 1 mois à 2-8 C° à l'abri de la lumière.

**-Mode opératoire:**

	Blanc	Étalon	Echantillon
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Étalon (µl)</b>	...	10	...
<b>Echantillon (µl)</b>	...	...	10

-Agiter bien et incuber pendant 5 min à 37°C, ou 10 min à la température de 25°C°.

-Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 505 nm et de l'étalon contre le blanc, la couleur est stable après 60 min.

**-Calcule :**

$$\text{Concentration du cholestérol (mg/dl)} = \frac{(\text{A}) \text{ échantillon}}{(\text{A}) \text{ étalon}} \times 200$$

-La concentration de l'étalon = 200 mg/dl.

-Facture de conversion : mg/dl x 0.025 = m mol/l.

**6.6. Dosage de créatinine (Murray *et al.*, 1984).** Selon la fiche technique Spinreact.

**-Principe :**

La créatinine présente dans le sérum forme en milieu alcalin un complexe coloré avec l'acide principal. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de créatinine.

**-Echantillon :** sérum

**-Réactifs utilisés :**

<i>Les réactifs</i>	<i>Composition</i>	<i>Concentration</i>
<b>R1</b>	Acide picrique	17.5 mol/l
<b>R2</b>	Hydroxyde de sodium	0.29 mol/l
<b>R3</b>	Etalon de la créatinine aqueux primaire	2 mg/dl

**-Préparation et stabilité**

-Les réactifs sont peut être à l'emploi, stable à température ambiante.

-Réactif du travail : mélanger à parts égales R1 et R2.

-Stabilité : 10 jours à 15-25 C°.

**-Mode opératoire**

	<b>Blanc</b>	<b>Etalon</b>	<b>Echantillon</b>
<b>RT (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Etalon (µl)</b>	...	100	...
<b>Echantillon (µl)</b>	...	...	100

-Mélanger et lire la densité optique DO1 après 30 sec, à 492 nm.

-Lire ensuite DO2 exactement 1 minute après.

**-Calcule :** calculé  $\Delta DO = DO2 - DO1$  pour le standard et les échantillons

-La concentration de l'étalon = 2 mg/dl.

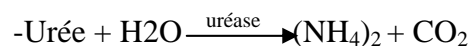
-Facture de conversion : mg/dl x 88.4 = µ mol/l.

$$\text{Concentration de la créatinine (mg/dl)} = \frac{\Delta DO \text{ Echantillon}}{\Delta DO \text{ Standard}} \times 2$$

**6.7. Dosage plasmatique de l'urée (kaplan *et al.*, 1984).** Selon la fiche technique Spinreact.

**-Principe :**

-La technique utilisée pour la détermination du taux de l'urée est la méthode enzymatique utilisant l'uréase selon la réaction suivante :



-Les ions d'ammonium peuvent réagir avec le salicylate et di hypochlorite de sodium pour donner un complexe coloré en vert, L'intensité de couleur est proportionnelle à la concentration de l'urée présentée dans l'échantillon.

**-Echantillon :** sérum

**-Réactifs utilisés :**

<i>Les réactifs</i>	<i>Composition</i>	<i>Concentration</i>
<b>R1 tampon</b>	phosphate	50 mol/l
	EDTA	2 m mol/l
	Salicylate de sodium	60 m mol/l
	Nitroprusside de sodium	3.2m mol/l
<b>R2 NaClO</b>	Hypochlorite de sodium	140 m mol/l
	Hydroxyde de sodium	150 m mol/l
<b>R3 Enzyme</b>	Uréase	3000 U/l
<b>R4 Etalon</b>	Etalon de l'urée aqueux primaire	50 mg/dl

**-Préparation de réactif de travail (RT) :**

-Dissoudre un comprimé de R3 Enzyme dans la fiole de R1.

-Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif de travail est stable 4 semaines à 2-8 C° ou une semaine à 15-25C°.

-Mode opératoire :

	<i>Blanc</i>	<i>Etalon</i>	<i>Echantillon</i>
<b>R (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Etalon (µl)</b>	...	10	...
<b>Echantillon (µl)</b>	...	...	10
<b>Mélanger et incuber pendant 5 min à 37C°, ou 10 min températures de 25C°</b>			
<b>R2 NaCLO (ml)</b>	1.0	1.0	1.0

-Mélanger et incuber pendant 5 min à 37C°, ou 10 min températures de 25C°.

-Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 580 nm et de l'étalon contre le blanc, la couleur est stable après 30 min à 15-25C°.

-**Calcule** : La concentration de l'urée est calculée par la formule suivante :

$$\text{Concentration de l'urée (mg/dl)} = \frac{(\text{A}) \text{ échantillon}}{(\text{A}) \text{ étalon}} \times 50$$

-La concentration de l'étalon = 50 mg/dl.

### 6.8. Dosage de la bilirubine totale (kaplan *et al.*, 1984). Selon la fiche technique Spinreact.

-**Principe** :

La bilirubine est définie comme la quantité de pigment dans le sérum réagissant avec l'acide sulfanilique diazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine quantifiable par spectrophotométrie.

Acide sulfanilique + Nitrite de sodium  $\xrightarrow{\text{réaction chimique}}$  Acide sulfanilique diazoté

Acide sulfanilique diazoté + Bilirubine  $\xrightarrow{\text{réaction de couplage}}$  Azobilirubine

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon.

-Echantillon : sérum.

-Réactifs utilisés :

Les réactifs	Composition	Concentration
<b>R1 (D)</b>	Acide sulfonique	30 mol/l
	Acide hydro chlorhydrique	150 m mol/l
<b>R2 (T)</b>	Acide sulfonique	30 m mol/l
	Acide hydro chlorhydrique	150 m mol/l
	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	7 mol/l
<b>R3</b>	Nitrite de sodium	29 m mol/l
<b>facultatif</b>	Etalon de bilirubine	Ref : 1002250

-Préparation de réactif de travail (RT): les réactifs sont prêts à l'emploi.

-Mode opératoire :

	Blanc	B totale	Blanc	B directe
<b>R1 (D) (ml)</b>	...	...	1.5	1.5
<b>R2 (T) (ml)</b>	1.5	1.5	...	...
<b>R3 (µl)</b>	...	50	...	50
<b>Echantillon /Etalon (µl)</b>	100	100	100	100

-Mélanger et incuber pendant 15 minutes à 15-25C°.

-Mesurer l'absorbance (A) à 555 nm.

**Calcule :** avec l'étalon

$$\text{-Bilirubine (mg/dl)} = \frac{(\text{A}) \text{ ech} - (\text{A}) \text{ banc ech}}{(\text{A}) \text{ étalon} - (\text{A}) \text{ blanc étalon}} \times \text{concentrations de l'étalon}$$

-Avec la facture :

$$\text{-Bilirubine (mg/dl)} = ((\text{A}) \text{ échantillon} - (\text{A}) \text{ blanc échantillon}) \times \text{Facture}$$

$$\text{facture} = \frac{\text{Concentration de l'étalon}}{(\text{A}) \text{ étalon} - (\text{A}) \text{ blanc étalon}}$$

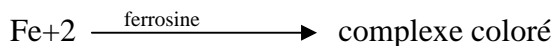
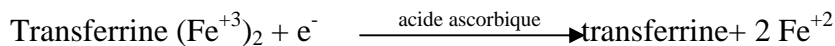
-Facture théorique : Bilirubine (T) = 19.1.

-Facture de conversion : mg/dl x 17.1 = m mol/l.

**6.9. Dosage du fer sérique (Perrotta *et al.*, 1984).** Selon la fiche technique Spinreact.

**-Principe :**

Le fer sérique (Fe<sup>+3</sup>) est dissocié de sa protéine porteuse, la transferrine dans un milieu acide, et immédiatement Fe<sup>+2</sup> dans sa forme ferreuse en présence dans sa forme ascorbique. Le fer ferreux donne avec la ferrozine un complexe coloré.



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du fer sérique dans l'échantillon.

**-Echantillon :** sérum

**-Réactifs utilisés :**

<i>Les réactifs</i>	<i>Composition</i>	<i>Concentration</i>
<b>R1 tampon</b>	Acétate ph 4,9	100 m mol/l
<b>R2 réducteur</b>	Acide ascorbique	99.7%
<b>R3 colore</b>	ferrozine	44 m mol/ l
<b>R4</b>	Etalon de fer sérique	100 µg/dl

**-Préparation des réactifs :**

**-Réactif de travail (RT):**

-Dissoudre le contenu dans le fiole de R1.

-Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif de travail est stable 3 mois à 2-8 C°, ou 1 mois à 15-25C°.

**-Mode opératoire :**

	<i>Blanc RT</i>	<i>Étalon</i>	<i>Blanc échant</i>	<i>échantillon</i>
<b>RT (ml)</b>	1.0	1.0	1.0	1.0
<b>R<sub>3</sub> goutte</b>	1	1	...	1
<b>Eau distillé (µl)</b>	200	...	...	...
<b>Étalon (µl)</b>	...	200	...	...
<b>Echantillon (µl)</b>	...	...	200	200

-Mélanger et incuber pendant 5 min à 37C°, ou 10 min à 15-25 min.

-Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 520 nm et de l'étalon contre le blanc RT, la couleur est stable après 30 min.

**-Calcule :** le calcule du fer sérique dans échantillon est calculer par la formule suivante :

$$\text{La concentration de fer sérique } (\mu\text{g/l}) = \frac{(\text{A})\text{échantillon} - (\text{A})\text{ blanc échantillon}}{(\text{A})\text{ étalon}} \times 100$$

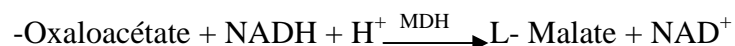
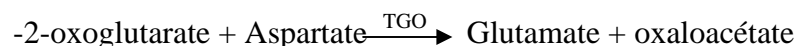
-Concentration de l'étalon=100 µg/dl

-Facteur de conversion : µg/dl x 0,179= m mol/l

**6.10. Dosage d'Aspartate-Aminotransférase (ASAT/TGO) (Bergmyer, 1980).** Selon la fiche technique Biomagheb.

**-Principe :**

Détermination cinétique de l'activité Aspartate Aminotransferase. Le schéma réactionnel est la suivante :



-Le taux de la diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité Aspartate-Aminotransférase dans l'échantillon.

-Echantillon : sérum

-Réactifs utilisés :

Les réactifs	Composition	Concentration
<b>R1 solution tampon</b>	Tampon Tris pH 7.8 à 30C°	80 m mol/l
	L-Asperate	200 m mol/l
<b>R2 substrat et enzymes</b>	NADH	0.18 m mol/l
	LDH	800 U/l
	MDH	600 U/l
	Oxoglutarate	12 m mol/l

-Préparation de réactif de travail et stabilité :

-Dissoudre le contenu de R2 dans la fiole de R1.

-Agiter bien et doucement jusqu'à elle devient homogène.

-Mode opératoire :

<b>Solution de travail</b>	<b>3 ml</b>
Préincuber à la température 37C°	
<b>Echantillon</b>	<b>50µl</b>
Mélanger et incuber les tubes préparés 1 minute à 37 C°. Mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minute à 340 nm.	

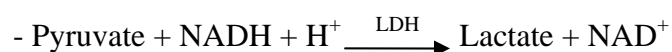
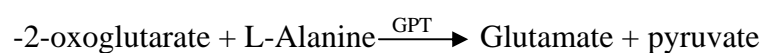
Activité (ASAT/TGO) UI/l =  $\Delta DO \times 175$

$\Delta DO$  : C'est la valeur moyenne des trois lectures

**6.11. Dosage de l'Alanine-Aminotransférase (ALAT/GPT) (Bergmyer, 1980).** Selon la fiche technique Biomaghreb.

**-Principe :**

Détermination cinétique de l'activité Alanine-Aminotransférase. Le schéma réactionnel est le suivant :



-Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité alanine transférase dans l'échantillon.

**Echantillon :** sérum.

**Réactifs utilisés :**

Les réactifs	Composition	Concentration
<b>R1 solution tampon</b>	Tampon Tris pH 7.5 à 30C°	100 m mol/l
	Alanine	500 m mol/l
<b>R2 substrat et enzymes</b>	NADH	0.18 m mol/l
	LDH	1200 U/l
	Oxoglutarate	15 m mol/l

**-Préparation de réactif de travail et stabilité :**

-Reconstituer chaque R2 par 1 flacon R1. Cette solution de travail est stable 7 jours à 2-8 C°  
24 heures à 20-25 C°.

**-Mode opératoire :**

<b>Solution de travail</b>	<b>3 ml</b>
Préincuber à la température 37C°	
<b>Echantillon</b>	<b>50µl</b>
Mélanger et incuber les tubes préparés 1 minute à 37 C°. Mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minute à 340 nm.	

$$\text{Activité (ALAT/GPT) UI/l} = \Delta DO \times 1750$$

**7. Dosage des paramètres du stress oxydant**

**7.1. Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-PX) dans l'épididyme**

- ❖ **Principe :** l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de **Flohé et Günzler (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



- ❖ **Mode opératoire :**

- Prélever 0.2 ml de l'homogénat.
- Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mm).
- Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mm, NaCl 150 mm pH 7.4).
- Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.

- Ajouter 0.2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,3 mm) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- Ajouter 1 ml de TCA (1 %) pour arrêter la réaction.
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- Prélever 0,48 ml du surnageant.
- Ajouter 2,2 ml de la solution tampon TBS.
- Ajouter 0,32 ml de DTNB (1 mm).
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

$$Q = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0.04}{\text{DO étalon}}$$

- ✓ Q : Quantité de GSH disparue (oxydée)
- ✓ DO échantillon : Densité optique de l'échantillon.
- ✓ DO étalon : Densité optique de l'étalon.
- ✓ 0.04 : Concentration du substrat (GSH).

$$\text{L'activité de la GPx (mmole de GSH oxydées/mg de protéines)} = \frac{Q \times 5}{1 \text{ mg de protéines}}$$

### 6.13. Dosage de malondialdéhyde (MDA) dans l'épididyme

- ❖ **Principe :** le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) médiées par les radicaux libres. Dans notre étude, les taux du MDA epididymaire a été évalué selon la méthode **d'Ohkawa et al. (1979)**. Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100 °C) entre le

MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol.

❖ **Mode opératoire :**

-Prélever 0,5 ml de l'homogénat.

Ajouter 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20 %.

-Ajouter 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 %.

-Mélanger et incuber au bain marie à une température de 100 °C pendant 15 minutes.

-Refroidir et additionner de 4 ml de *n*-butanol.

-Centrifuger pendant 15 minutes à 3000 tours/min.

-Récupérer le surnageant, et lire la densité optique à 530 nm contre le blanc.

- ❖ la quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nm/gramme de tissu (foie ou reins). Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du 1,1', 3,3' tetraethoxypropane faite dans les mêmes conditions.

## **7. Techniques histologiques (Martoja & Martoja, 1967)**

### **A) Fixation**

Cette étape est la plus importante de la préparation histologique ; elle a pour but d'immobiliser les structures en respectant dans la mesure du possible leur morphologie, de les conserver, permettre la confection de préparation permanente et renforcer l'intensité de la coloration ultérieure (**Gabe, 1968**). L'agent fixateur, d'une manière générale, coagule et ou solidifie le gel protéique qui circule entre les mailles du réseau membranaire limitant le hyaloplasme et les organites.

Les organes sont plongés dans un volume (environ 60 fois supérieur à celui de l'organe) de Bouind-hollande 2 à 3 jours, pour la coloration topographique.

❖ **Liquide de Bouin-Hollonde :**

**a) Solution mère**

- Eau distillée (100 ml).
- Acétate de cuivre (2,5 g).
- Ajouter peu à peu, en reuant 4 g d'acide picrique (ne jamais broyer à sec, risque d'exposition).
- Filtrer la solution.

**b) Bouin-Hollande :** au moment de l'emploi on mélange :

- Solution mère (100 ml).
- Formol neutre à 40 % (10 ml).
- Acide acétique (5 ml).

- ❖ Après fixation, les pièces sont lavées pendant 24 h à l'eau courante renouvelée plusieurs fois avant la déshydratation, chaque pièce étant accompagnée dans le flacon d'une étiquette portant l'ensemble des indications utiles.

**B) Inclusion dans la paraffine**

Le but de l'inclusion est de donner aux pièces la consistance ferme nécessaire à la coupe, l'ensemble du processus d'inclusion comporte quatre étapes :

❖ **Déshydratation :**

- La pièce est trempée successivement dans l'alcool à 70°, l'alcool à 96° et enfin dans l'alcool absolu, en respectant les temps.
- Deux bain d'alcool à 70°, dont le premier peut assurer une conservation illimitée et un 2<sup>ème</sup> bain de 30 min (alcool à 70° : 100 ml d'alcool à 96 + 40,85 ml d'eau distillée).

-Deux bains d'alcool 96° de 30 min.

-Deux bains d'alcool 100° de 30 min.

❖ **Eclaircissent ou imprégnation par le liquide intermédiaire :**

Cette étape permet l'élimination complète des traces d'alcool et l'imprégnation par le solvant de la paraffine, qui est le butanol. La durée du premier bain est de 24 heures, le second bain dure au moins trois jours.

❖ **Emparaffinage ou pénétration des pièces par la paraffine :**

Le but de cette étape est d'obtenir une imprégnation aussi complète que possible des pièces par la paraffine. La pièce est passée successivement dans 3 bains de paraffine d'une durée de 2 heures chacun à la température de fusion de la paraffine (56 à 58°C) : le premier bain est formé d'un mélange de butanol et de paraffine (v/v), les deux autres de paraffine pure.

❖ **Mise en bloc en enrobage proprement dit :**

Nous avons utilisé des moules de métal (Tissu-TEK III) et des cassettes en plastique sur lesquelles sont inscrits les numéros des pièces. La paraffine liquide est versée dans les moules légèrement préchauffés à 45°C. La pièce à inclure est déposée, et une cassette est placée sur le moule. Le bloc est refroidi rapidement sur une plaque métallique réfrigérée, environ 15 min plus tard, le bloc a complètement durci et il est prêt à être coupé.

**C) Confection des coupes :**

La confection des coupes a été réalisée à l'aide d'un microtome de type HistoRange, LKB. Après installation du bloc, le rabotage commence en ajustant l'échelle à 20 ou 15 µm, celle-ci est ramenée à 4 µm ou moins, pour avoir des coupes fines.

**D) Etalement des coupes :**

L'étalement des coupes a été effectué dans un bain thermostaté dont la température est inférieure, d'au moins 5 à 10°C, au point de fusion de la paraffine. Les coupes recueillies sont ensuite collées sur les lames de verre puis séchées à 60°C dans une étuve. A l'aide d'un diamant, les indications de l'organe sont préalablement gravées sur la lame.

**E) Coloration :** Le but de la coloration est de rendre plus évidents les différents constituants cellulaires et tissulaires. Ceci est obtenu à l'aide d'une coloration topographique au hématoxyline, qui est la plus couramment employée.

Les coupes ne seront prêtes à recevoir les colorants qu'après les deux étapes suivantes :

❖ **Déparaffinage :** le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Le réactif utilisé est le toluène. Les coupes sont passées dans 4 bains de toluène pendant 5 à 10 min chacun. Le toluène du dernier bain doit être pur.

❖ **Hydratation :** elle a pour objet de retirer le toluène du tissu et le remplacer par l'eau. Les pièces sont passées dans l'éthanol l'un à 96° et l'autre à 70° d'une durée de 3 à 5 min chacun. Les pièces sont enfin lavées à l'eau courante pendant 5 min environ avant coloration.

❖ **Colorations proprement dites :**

Coloration au hématoxyline-éosine, cette technique est utilisée pour mettre en évidence les éléments cellulaires et tissulaires, le noyau apparaît coloré en bleu, le cytoplasme et le tissu conjonctif extracellulaire en rose.

**Hémalum acide de Mayer**

- Hématoxyline (1g)
- Eau distillée (1000 ml)
- Dissoudre à chaud et refroidir
- Iodate de Na (0.2 g)
- Alun de K (50 g)
- Dissoudre
- Hydrate de chloral (1g)
- Acide citrique (1g)
- Dissoudre et conserver bouché
- Eosine
- Eau distillée

Les lames sont mises dans l'Hémalun pendant 6 min, rincer à l'eau. Puis dans l'HCL 0.5% en faisant plonger les lames 2 fois et dans lithinée 2 min avant de rincer, les faire passer dans l'éosine pendant 5 min, puis rincer 3 fois pendant 5 min.

❖ **Déshydratation :**

Les lames colorées sont plongées successivement pendant quelques secondes dans l'alcool à 70°, l'alcool à 96° et enfin dans deux bains d'alcool absolu, le premier pendant quelques secondes et le second pendant 5 min, toluène 5 min.

**F) Le montage :**

Le montage et l'opération qui consiste à fixer, à l'aide d'une goutte de l'Eukitt, une lamelle de verre sur l'échantillon histologique, qui permette l'adhérence entre la lame et la lamelle. Une légère pression sur la lamelle permet de chasser les bulles d'air. Après montage, les lames sont séchées sur papier absorbant, nettoyées au toluène puis observées par un microscope optique.

## **9. Etude statistique**

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins (Moy  $\pm$  SEM) l'écart type moyen. La comparaison entre les différents groupes sont effectuées après une analyse de *t* de *Student*. L'analyse statistique des données a été réalisée grâce au logiciel *MINITAB* (Version 16).

Les différences sont considérées comme :

- ✓ Significatives lorsque ( $P \leq 0,05$ ).
- ✓ Hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ).
- ✓ Très hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ). Avec P: Seuil de signification.



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

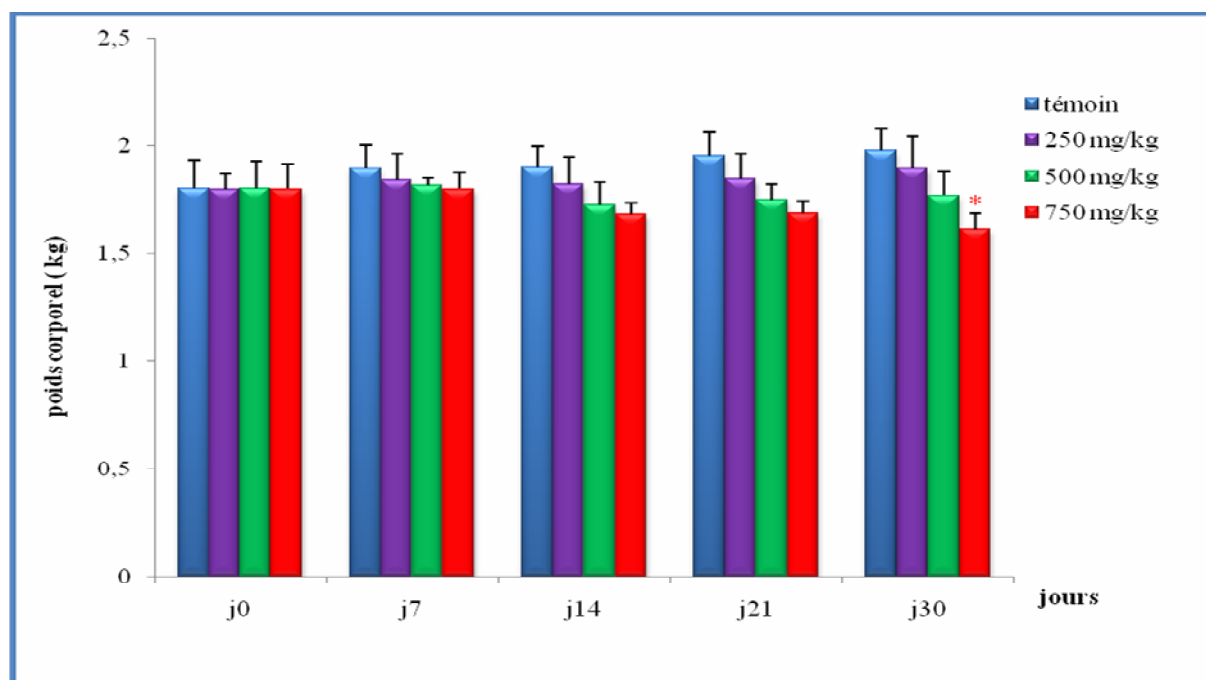
### III. RESULTAS

#### 1. Les paramètres de croissance

##### 1.1. Le poids corporel

Par rapport au groupe témoin, aucune différence significative ( $P \geq 0.05$ ) n'a été notée chez les 3 groupes traités au cours des trois premières semaines expérimentales. Cependant, une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) du poids corporel a été enregistrée au cours de la dernière semaine (30 j) du traitement chez le groupe traité au 750 mg/kg/j de DBP par rapport au groupe témoin.

Le détail dans la variation du poids corporel pour les différents groupes durant les 4 semaines expérimentales apparaît à la Figure 5.



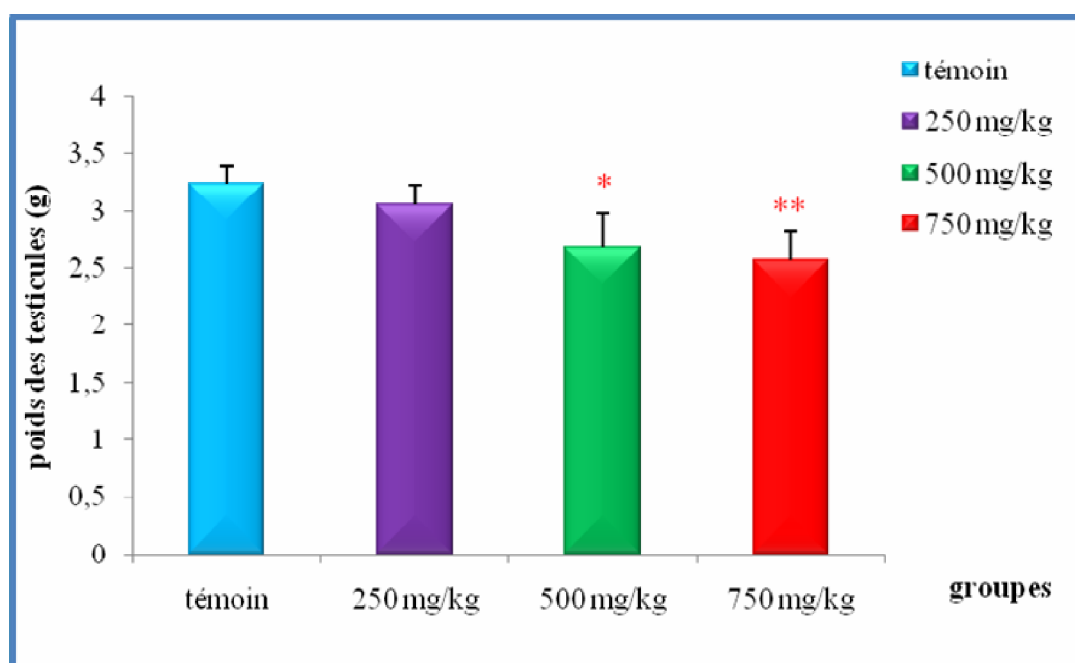
**Figure 5 :** Poids corporel (g) des lapins témoins et traités aux trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales. ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

## 1.2. Poids absolu de certains organes

### 1.2.1. Poids absolu des testicules

Les résultats dans la pesée des testicules révèlent chez le groupe traité à la dose de 500 mg/kg/j de DBP une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) du poids par rapport au groupe témoin. L'analyse montre aussi qu'en présence d'une dose élevée, 750 mg/kg/j du DBP, le poids des testicules diminue d'une manière hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) par rapport au groupe témoin. Voir Figure 6.



**Figure 6:** Poids absolu des testicules (g) des lapins témoins et traités aux trois doses du DBP

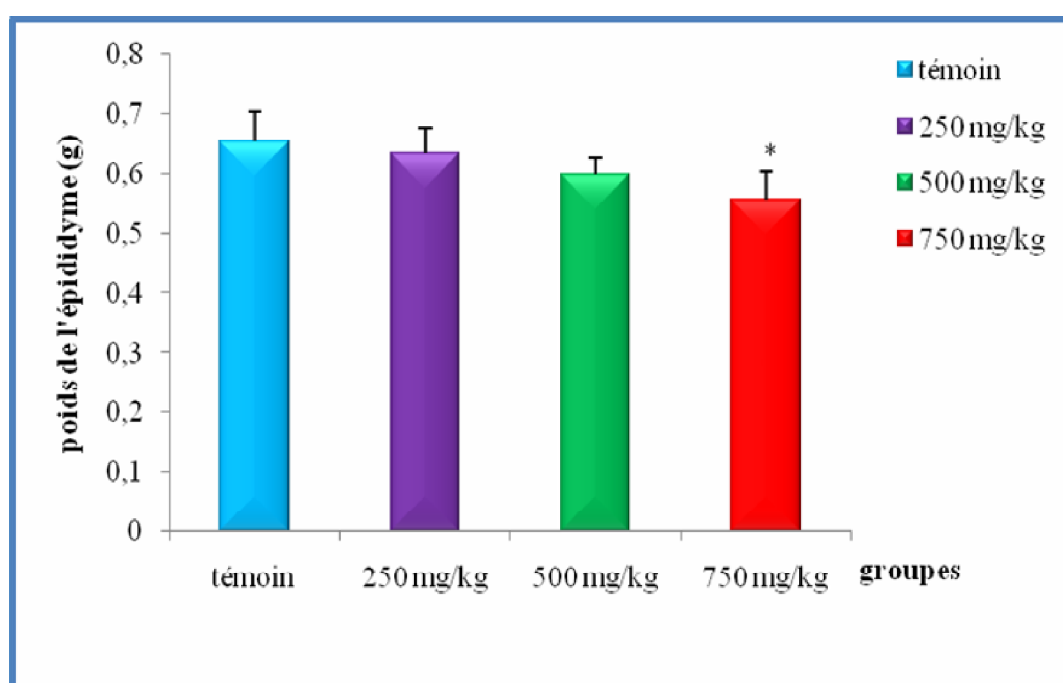
durant 4 semaines expérimentales. ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0,05$ . \*\*  $P \leq 0,01$ . \*\*\*  $P \leq 0,001$ ).

### 1.2.2. Poids absolu de l'épididyme

Le poids absolu de l'épididyme a été également mesuré afin de savoir l'effet du DBP sur la quantité de spermatozoïdes présente à son sein.

Les résultats obtenus révèlent qu'il existe une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) du poids absolu de l'épididyme chez le groupe traité au 750 mg/kg/j du DBP par rapport au groupe témoin. Voir Figure 7.



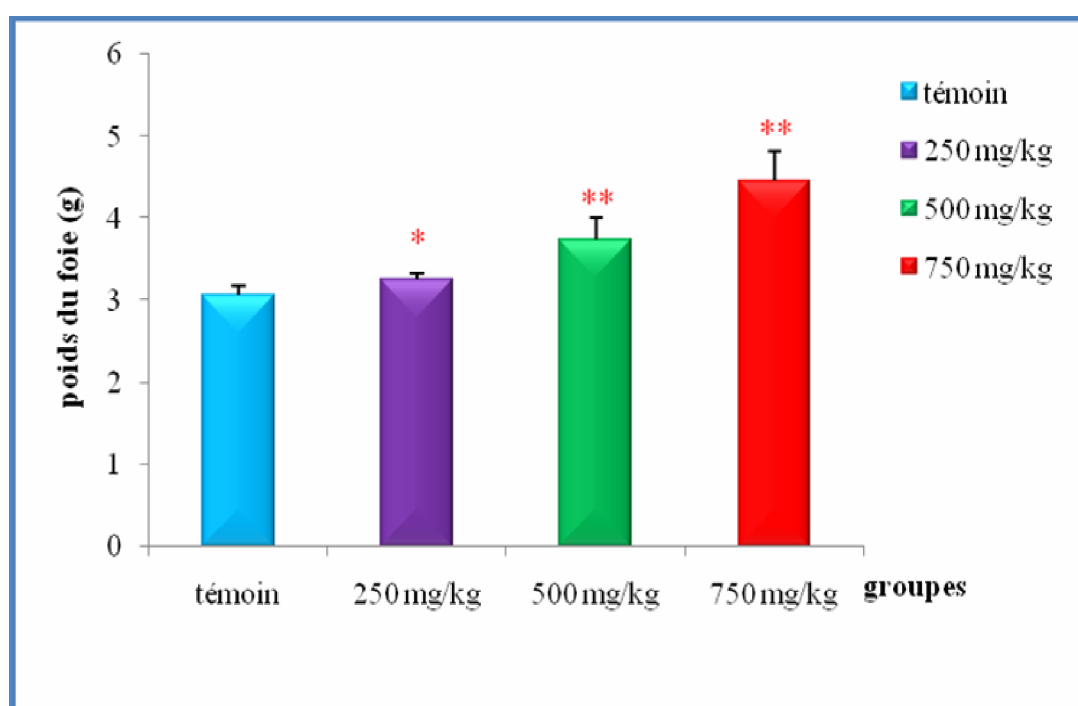
**Figure 7 :** Poids absolu de l'épididyme (g) des lapins témoins et traités aux trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales. ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

### 1.2.3. Poids absolu du foie

Les résultats montrent que le DBP exerce un effet sur le foie. En effet, le poids augmente chez les trois groupes (250, 500, 750) mg/kg/j du DBP par rapport au groupe témoin. Il est significatif ( $P \leq 0.05$ ) chez le 1<sup>er</sup> groupe (250 mg/kg/j), hautement significatif chez le 2<sup>ème</sup> groupe (500 mg/kg/j) et très hautement significatif ( $P \leq 0,01$ ) chez le 3<sup>ème</sup> groupe.

Le détail des résultats sont sur la Figure 8.

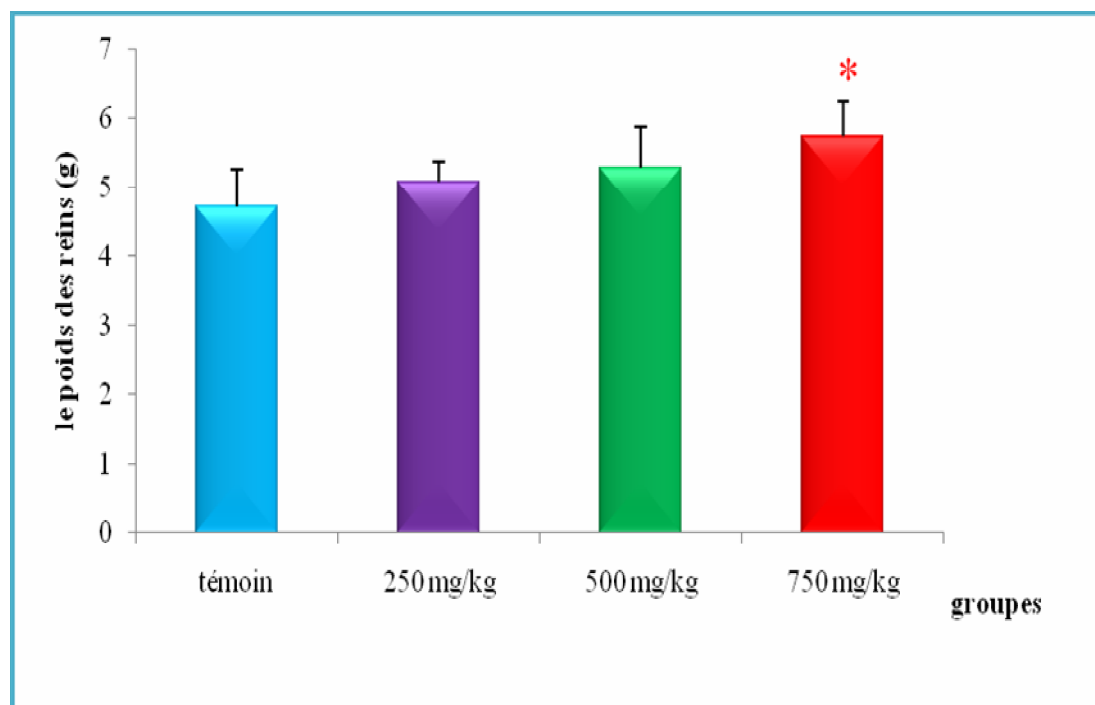


**Figure 8 :** Poids absolu du foie (g) des lapins témoins et traités par trois doses du DBP durant 4 semaines expérimentales. ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

#### 1.2.4. Poids absolu des reins

L'analyse a démontré que le poids des reins semble subir un effet significatif ( $P \leq 0,05$ ) à dose élevée du DBP (750 mg/kg/j). Chez les deux autres groupes (DI et DII), l'analyse des résultats ne démontre pas d'augmentation significative ( $P \geq 0,05$ ) dans le poids de leurs reins. Voir Figure 9.



**Figure 9** : Poids absolu des reins (g) chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP

durant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0,05$ . \*\*  $P \leq 0,01$ . \*\*\*  $P \leq 0,001$ ).

### 3. Les paramètres hématologiques

Les résultats de la deuxième étude, sont résumés dans le Tableau 3.

Les résultats concernant le nombre des globules rouges (RBC) et de l'hématocrite, révèlent que les lapins traités avec la dose III (750 mg/kg/j) du DBP présentent un profil significatif (une diminution) ( $P \leq 0.05$ ) versus les témoins. Pour le taux des globules rouges et l'hématocrite, il diminue significativement chez le groupe DIII (750 mg/kg/j) du DBP. Le taux de l'hémoglobine diminue significativement et hautement significativement chez le lot DII et DIII (500, 750) mg/kg/j du DBP respectivement.

**Tableau 3:** Les variations des paramètres sanguins chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP après 4 semaine expérimentales.

Paramètres	DBP (mg/kg/j)			
	Témoin	250 mg/kg	500 mg/kg	750 mg/kg
RBC ( $10^{12}/l$ )	6,514 ± 0,61	6,31 ± 0,53	5,908 ± 0,277	5,73 ± 0,292*
HB (g/dl)	118,6 ± 15,8	105 ± 11,8	94±11,8*	90±12,9**
HT (%)	36,99 ± 2,04	36,29 ± 1,8	35,08 ± 1,09	34,11 ± 1,56*
WBC ( $10^9/l$ )	12,29±0,414	12,738 ± 0,543	12, 942±0,561	13,018 ± 0,643
PL ( $10^9/l$ )	432,8±62,4	433,6±63,6	433,8±60,8	434,4±62,8
MCV (fl)	57,6±2,07	56,8±1,92	56,2±1,79	55 ± 1,58
MCH (pg)	20,02±1,04	19,62±0,746	19,36±0,817	19,16±1
MCHC (g/dl)	414±11,4	42,4±14,8	340,6±8,38	337,2±9,63

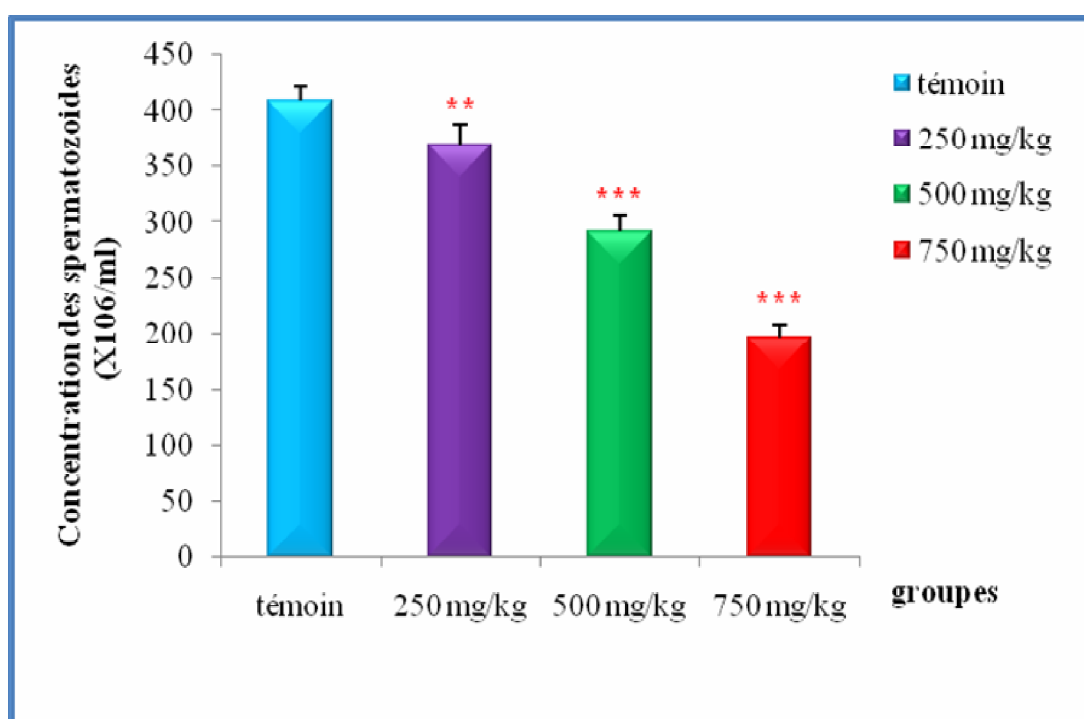
*Les valeurs sont données comme moyenne ± SEM, la différence significative*

*(\* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ )*

## 4. Etude biologique des spermatozoïdes

### 4.1. Variation de la concentration des spermatozoïdes ( $\times 10^6/\text{ml}$ )

Les résultats présentés dans la Figure 10, montrent une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de la concentration des spermatozoïdes chez le groupe traité avec 250 mg/kg/j du DBP par rapport au groupe témoin. Les données révèlent aussi une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de la concentration des spermatozoïdes chez les groupes traités avec 500 et 750 mg/kg/j du DBP par rapport au groupe témoin.

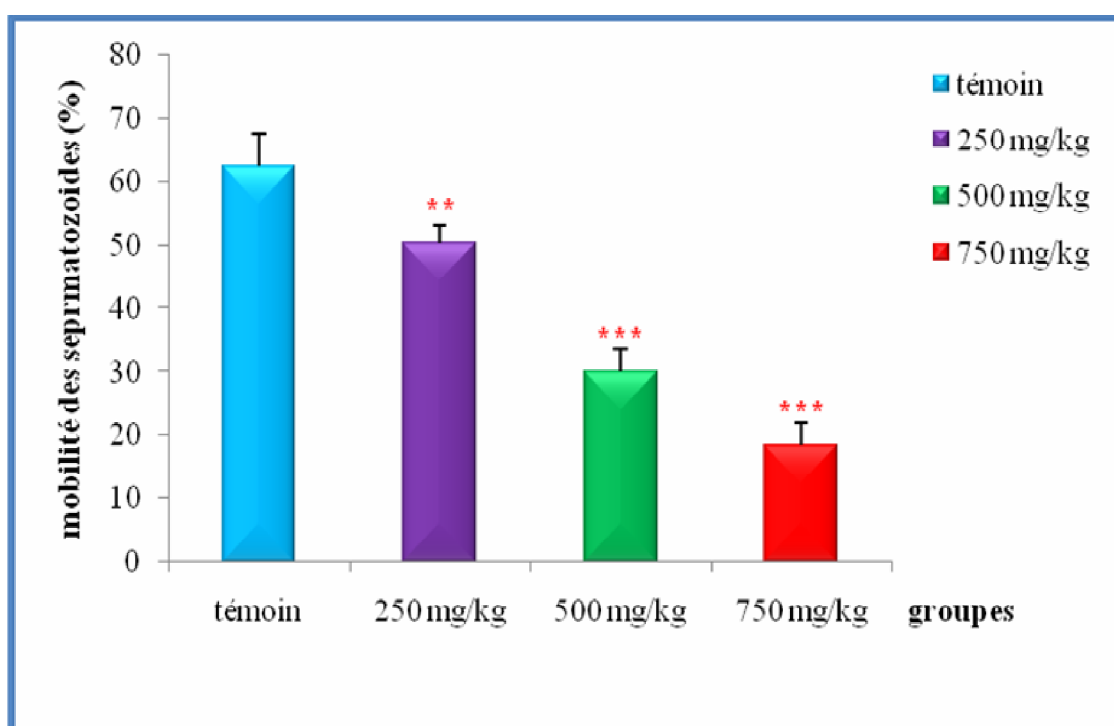


**Figure 10:** Concentration des spermatozoïdes ( $\times 10^6/\text{ml}$ ) chez les lapins témoins et traités pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

#### 4.2. Variation du taux de la mobilité des spermatozoïdes (%)

Les résultats présentés dans la Figure 11, montrent une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de la mobilité des spermatozoïdes chez le groupe traité avec 250 mg/kg/j du DBP par rapport au groupe témoin. Les données révèlent aussi une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de la mobilité des spermatozoïdes chez les groupes traités avec 500 et 750 mg/kg/j du DBP par rapport au groupe témoin.

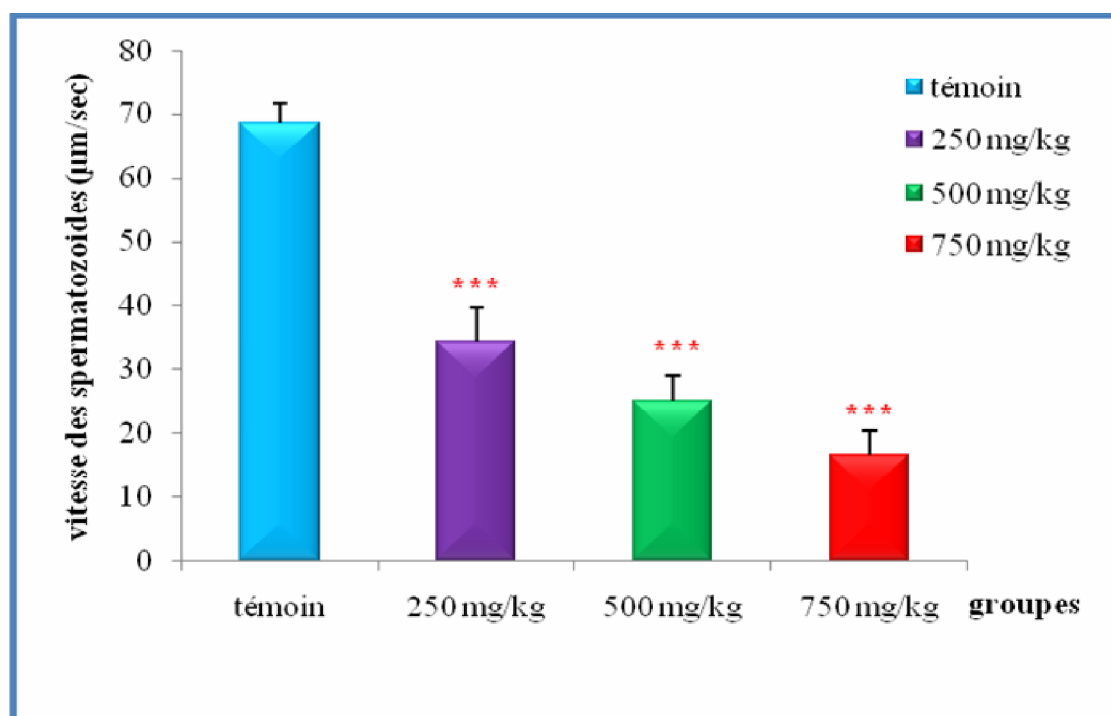


**Figure 11 :** Mobilité des spermatozoïdes (%) chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ )

### 4.3. Variation de la vitesse des spermatozoïdes ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )

L'analyse des résultats a révélé par rapport au groupe témoin, une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) et très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de la vitesse des spermatozoïdes chez les groupes traités au 250 mg/kg/j et chez les groupes traités avec 500 et 750 mg/kg/j de DBP respectivement. Voir Figure 12.



**Figure 12 :** Vitesse des spermatozoïdes chez les lapins témoins et traités par trois doses du

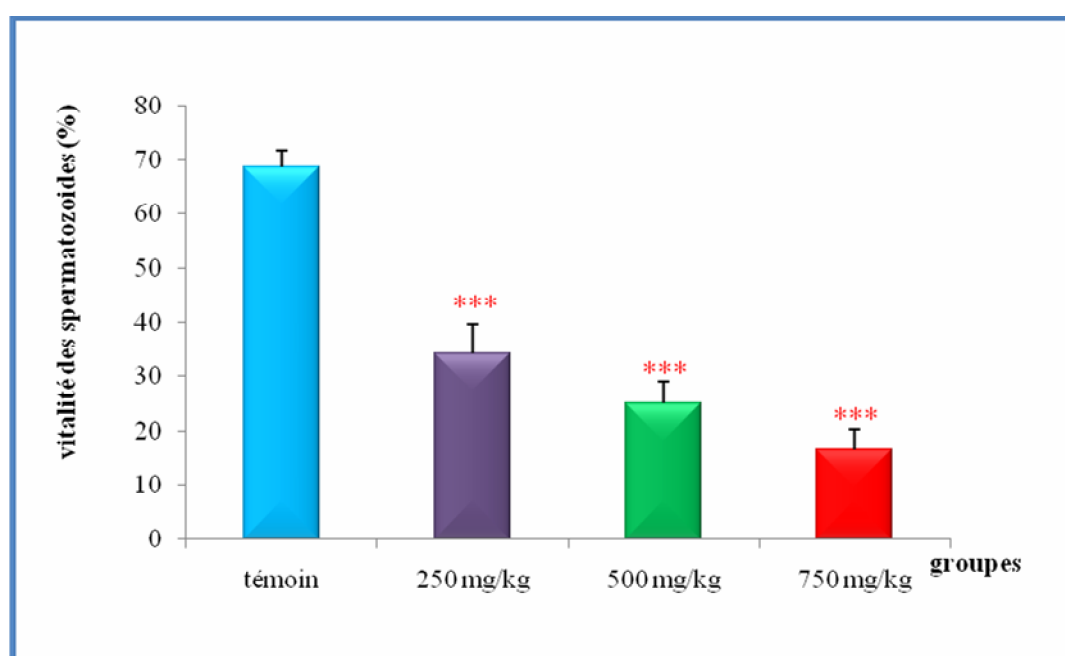
DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

#### 4.4. Variation de la vitalité des spermatozoïdes (%)

##### 4.4.1. Coloration vitale

Les données démontrent une diminution très hautement significative du taux des spermatozoïdes vivants ( $P \leq 0,001$ ) chez les groupes traités au 250, 500, 750 mg/kg/j du DBP par rapport au groupe témoin. Voir Figure 13.



**Figure 13:** Vitalité des spermatozoïdes chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

#### **4.4.2. Les malformations morphologiques des spermatozoïdes**

##### **❖ Modification faible du flagelle (représentation A)**

L'analyse des résultats montre une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) des spermatozoïdes à faible modification du flagelle chez le groupe DII par rapport au groupe témoin. Chez les deux autres groupes, DII et DIII, la diminution est hautement significative des spermatozoïdes à faible modification du flagelle versus témoin. Voir Figure 14.

##### **❖ Modification importante au niveau du flagelle (représentation B)**

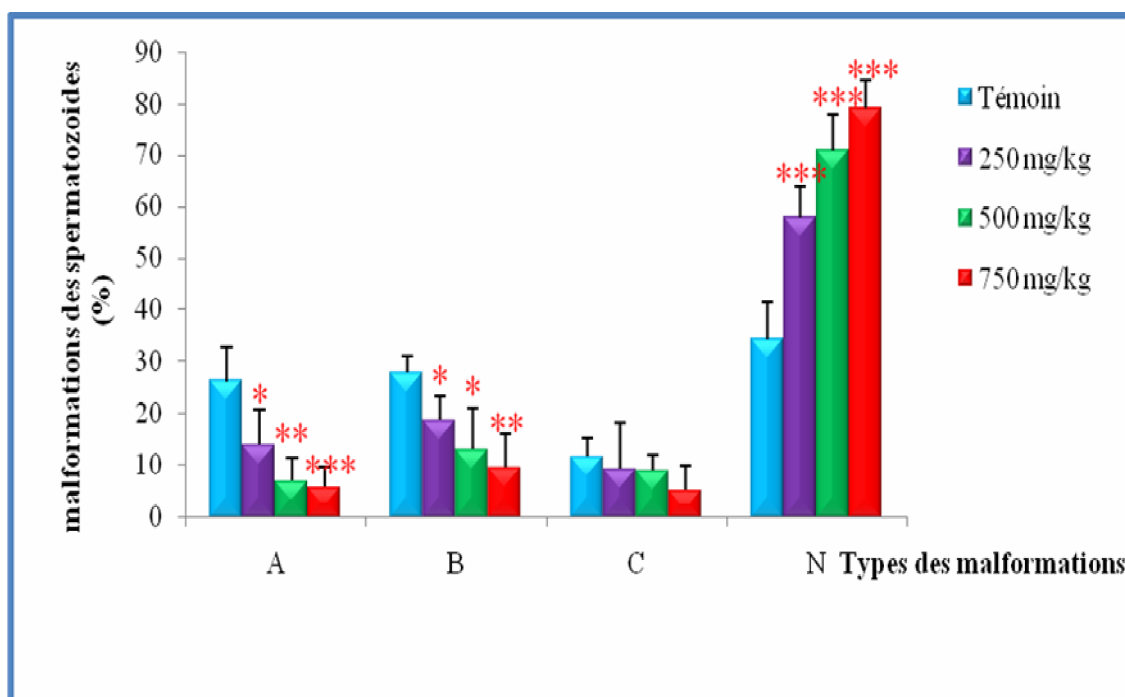
Au niveau de la représentation B, une différence significative ( $P \leq 0,05$ ) a été trouvée chez les groupes traités avec 250 et 500 mg/kg/j de DBP par rapport au groupe témoin. Elle est hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) chez le groupe traité avec 750 mg/kg/j au DBP par rapport au groupe témoin. Voir Figure 14.

##### **❖ Modification importante au niveau du flagelle et la pièce intermédiaire (représentation C)**

Il ne semble pas y avoir de différence significative au niveau de la représentation C entre les trois groupes traités au DBP et le groupe témoin. Voir Figure 14.

##### **❖ Spermatozoïdes normaux (représentation N)**

Les résultats montrent une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) du nombre des spermatozoïdes normaux (morts) chez les groupes traités avec 250, 500 et 750 mg/kg/j de DBP par rapport au groupe témoin. Voir Figure 14.



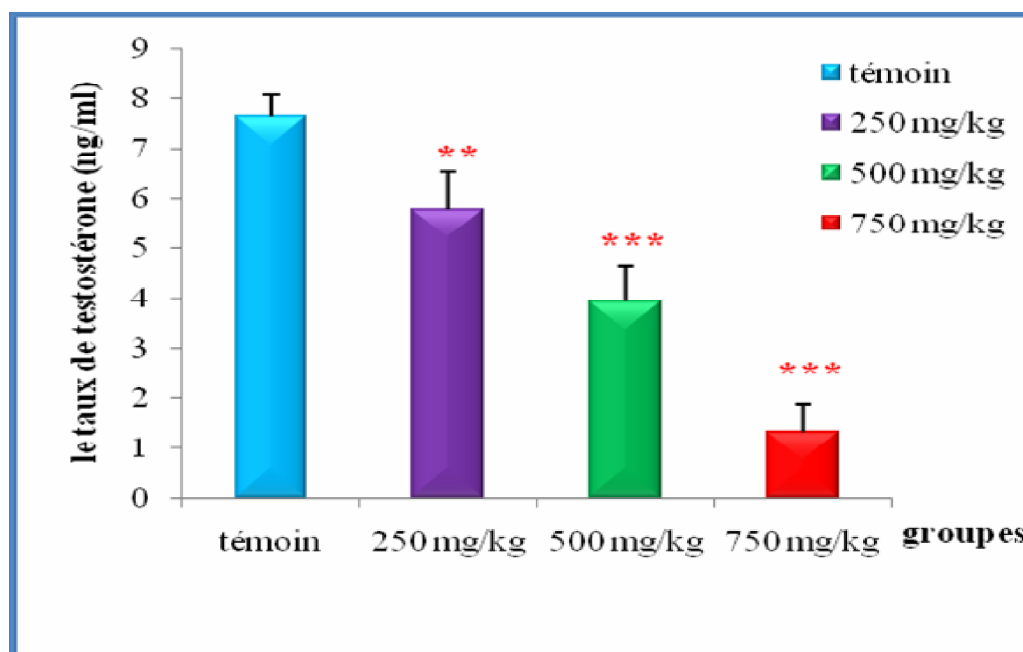
**Figure 14 :** Les malformations au niveau de flagelle et la pièce intérimaire des spermatozoïdes chez les lapins témoins et traités aux trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification : \*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

## 5. Paramètre hormonal

### 5.1. Variation du taux plasmatique de la testostérone

Les résultats du dosage des concentrations plasmatiques de la testostérone des lapins après 4 semaines du début du traitement par le DBP sont présentés dans la Figure 15.

Les résultats obtenus, montrent que chez les groupes traités avec 250 mg/kg/j du DBP et avec 500 et 750 mg/kg/j du DBP des différences hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) et très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) respectivement, ont été obtenus par rapport au groupe témoin.



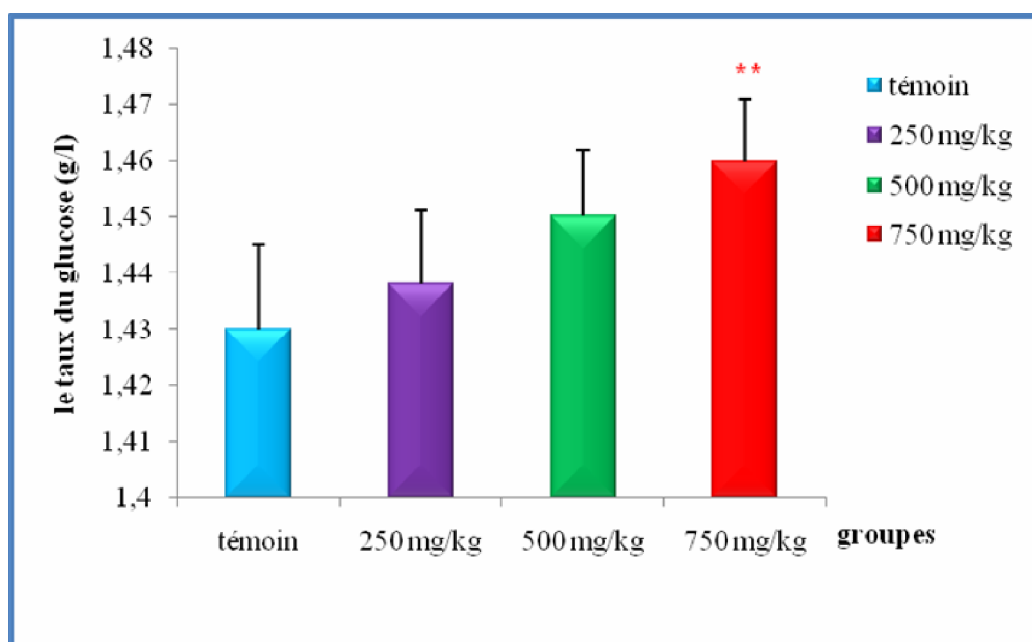
**Figures 15:** Taux plasmatique de la testostérone chez les lapins témoins et traités aux trois doses de DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

## 6. Etude biochimique

### 6.1. Taux plasmatique du glucose

Pour ce qui est du taux plasmatique de glucose, seul le groupe DIII (750 mg/kg) du DBP affiche des niveaux plus élevés ( $P \leq 0.01$ ) par rapport au témoin. Voir Figure 16.

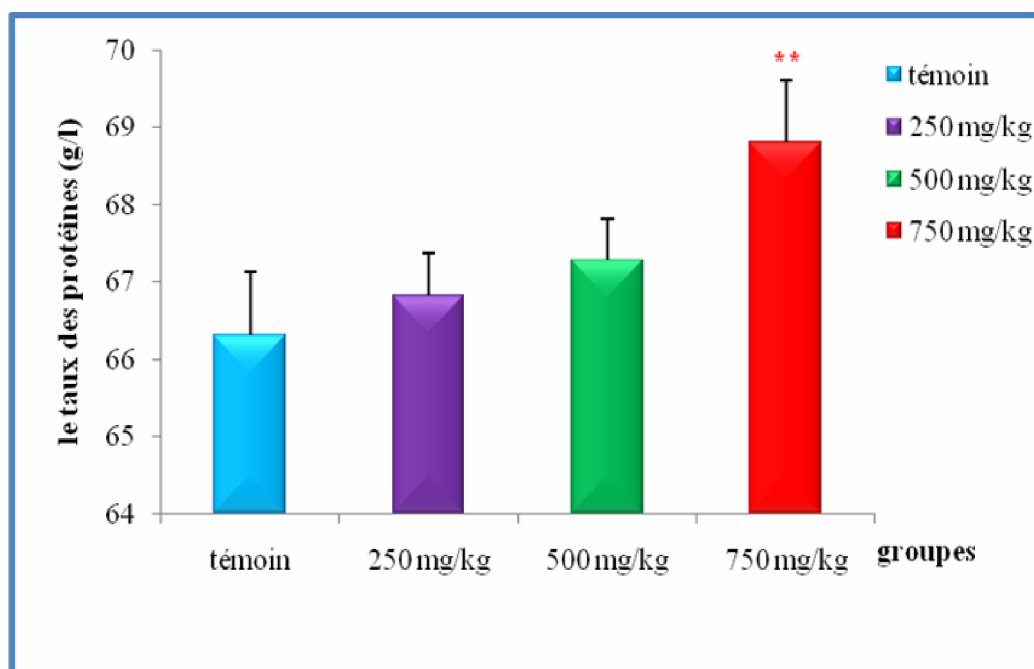


**Figures 16:** Taux plasmatique du glucose (g/l) chez les lapins témoins et traités aux trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

## 6.2. Taux plasmatique des protéines totales

La Figure 17 représente les données après dosages des protéines totales chez les animaux témoins et traités au DBP pendant les 4 semaines expérimentales. Une augmentation hautement significative ( $P \leq 0.01$ ) du taux plasmatique des protéines totales a été observée chez les animaux traités au 750 mg/kg/j par rapport au groupe témoin.

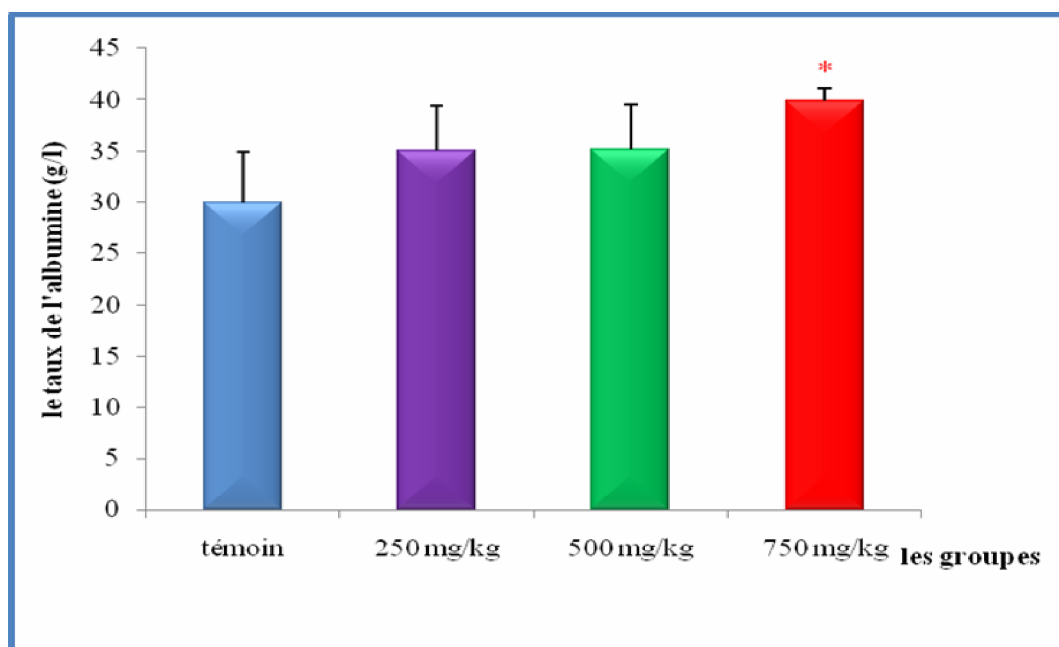


**Figures 17:** Taux sérique des protéines chez les lapins témoins et traités aux trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

### 6.3. Taux plasmatique d'albumine

Les résultats ont révélé que le taux de l'albuminémie n'augmente significativement ( $P \leq 0.05$ ) que chez le groupe traité au 750 mg/kg/j du DBP par rapport au groupe témoin. Le détail se trouve à la Figure 18.



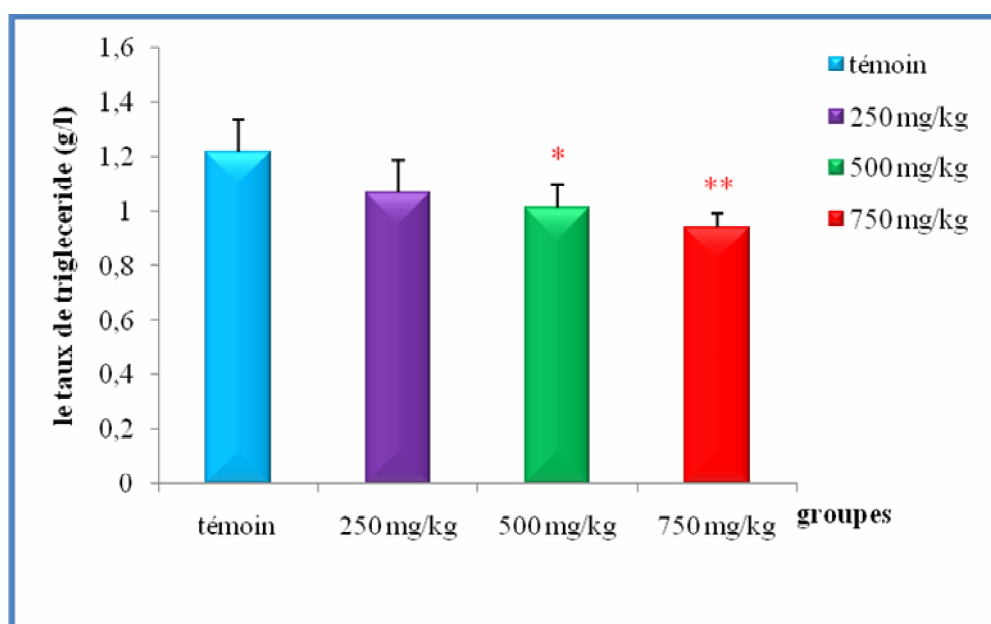
**Figures 18:** Taux plasmatique d'albumine chez les lapins témoins et traités aux 3 doses de DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

#### 6.4. Taux plasmatique des triglycérides

La concentration plasmatique des triglycérides chez tous les groupes d'animaux pendant les 4 semaines de traitement est représentée sur la Figure 19.

Les résultats obtenus montrent une diminution significative du taux plasmatique des triglycérides chez le groupe traité avec au 500 mg/kg du DBP. Les résultats montrent aussi une diminution hautement significative chez le groupe traité au 750 mg/kg/j par rapport au groupe témoin.

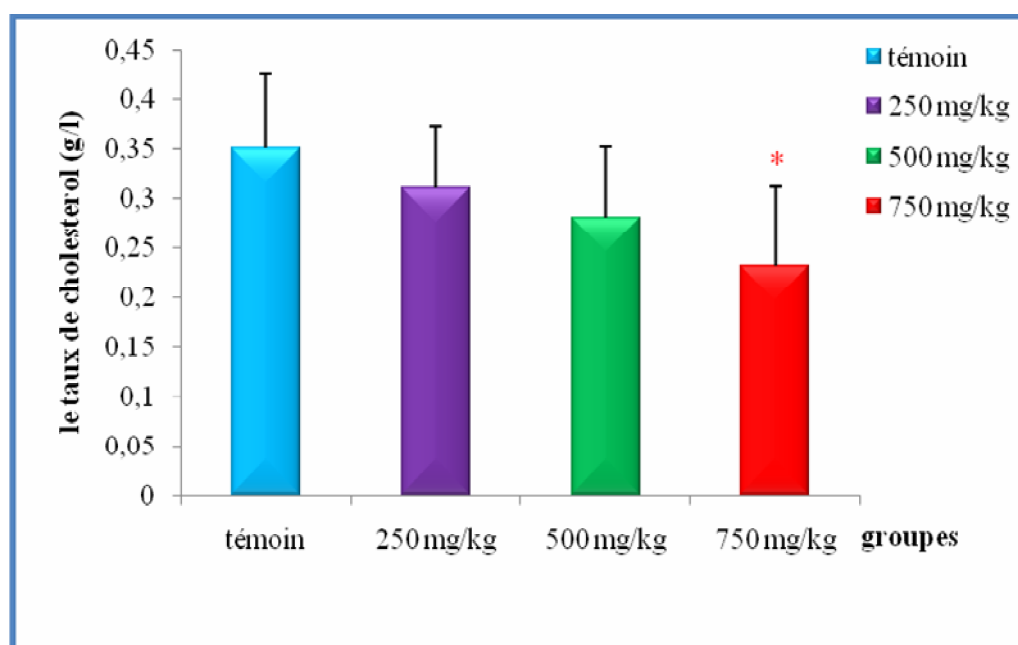


**Figures 19:** Taux plasmatique des triglycérides chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

### 6.5. Taux plasmatique du cholestérol

La concentration plasmatique du cholestérol chez tous les groupes pendant 4 semaines est indiquée sur la Figure 20. Les résultats obtenus montrent qu'à forte dose (750 mg/kg/j du DBP), cela génère une diminution significative du taux plasmatique de cholestérol chez les animaux du groupe DIII versus groupe témoin.

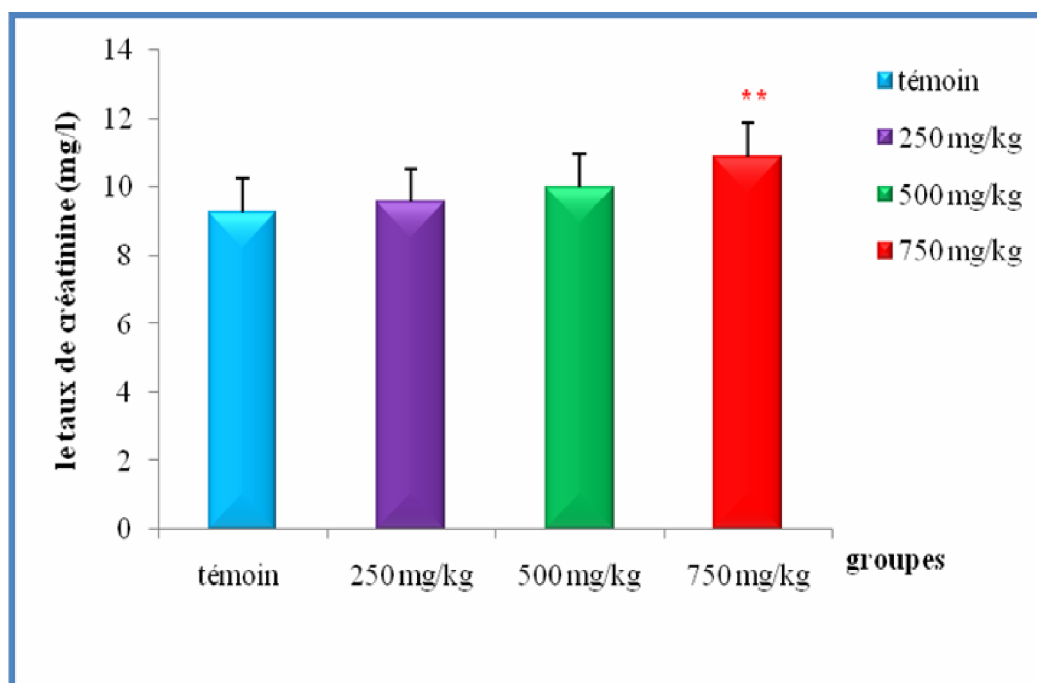


**Figures 20:** Taux plasmatique du cholestérol chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

## 6.6. Taux plasmatique de la créatinine

Les résultats de cette analyse montrent une augmentation hautement significative ( $P \leq 0.01$ ) du taux plasmatique de créatinine chez les animaux traités avec 750 mg/kg/j du DBP par rapport au groupe témoin. Voir Figure 21.



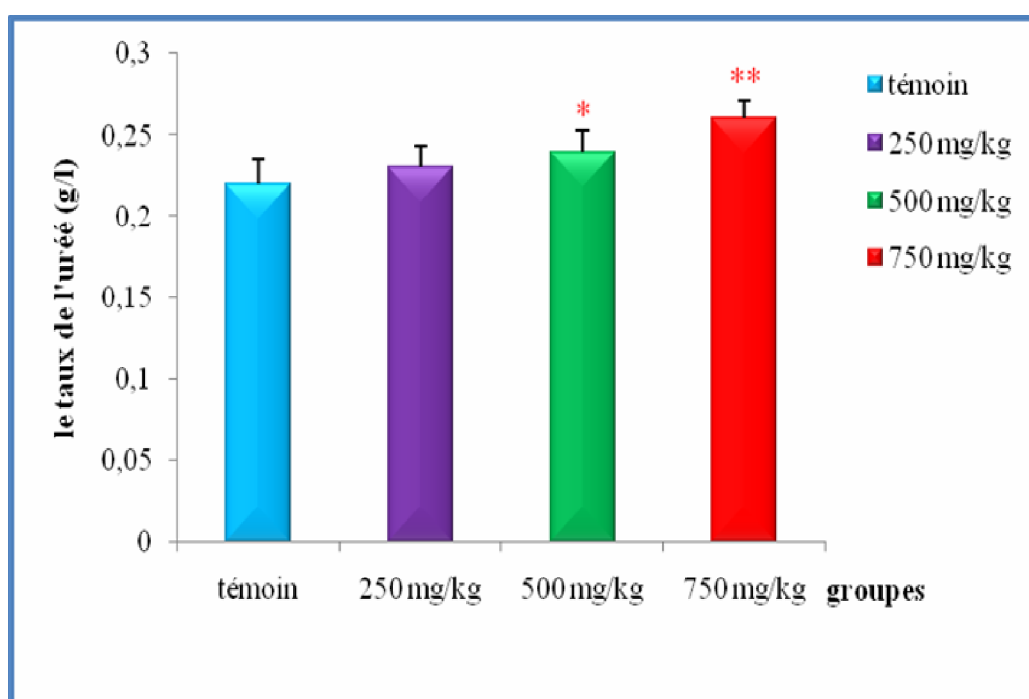
**Figures 21:** Taux plasmatique de la créatinine chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

## 7. Taux plasmatique de l'urée

Le taux plasmatique de l'urée chez les groupes traités et témoins pendant les 4 semaines expérimentales est indiqué dans la Figure 22.

Les résultats montrent une augmentation des taux plasmatique de l'urée chez deux lots, DII et DIII par rapport au groupe témoin. Cette augmentation est significative ( $P \leq 0.05$ ) et hautement significative ( $P \leq 0.01$ ) respectivement.



**Figures 22:** Taux plasmatique de l'urée chez les lapins témoins et traités par trois doses du

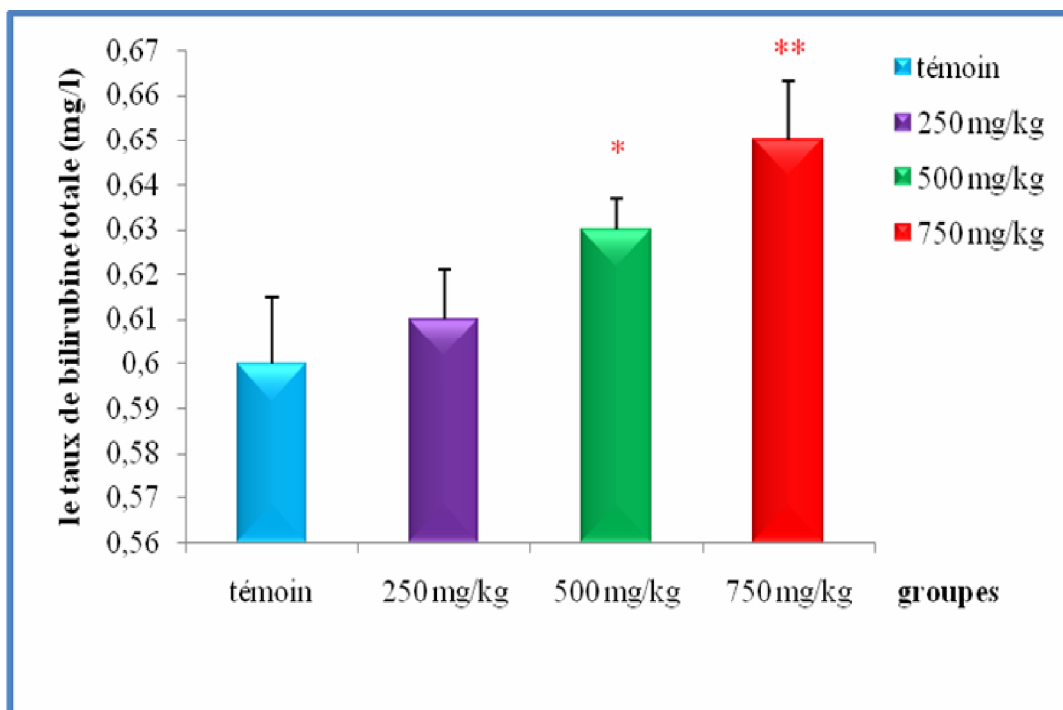
DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

### 6.8. Taux plasmatique de la bilirubine totale

Le taux plasmatique de la bilirubine totale chez les groupes traités et témoins pendant les 4 semaines expérimentales est indiquée dans la Figure 23.

Comparativement au lot témoin, l'analyse des données a montré des différences significative ( $P \leq 0.05$ ) et hautement significative ( $P \leq 0.01$ ) chez les deux groupes DII et DIII.



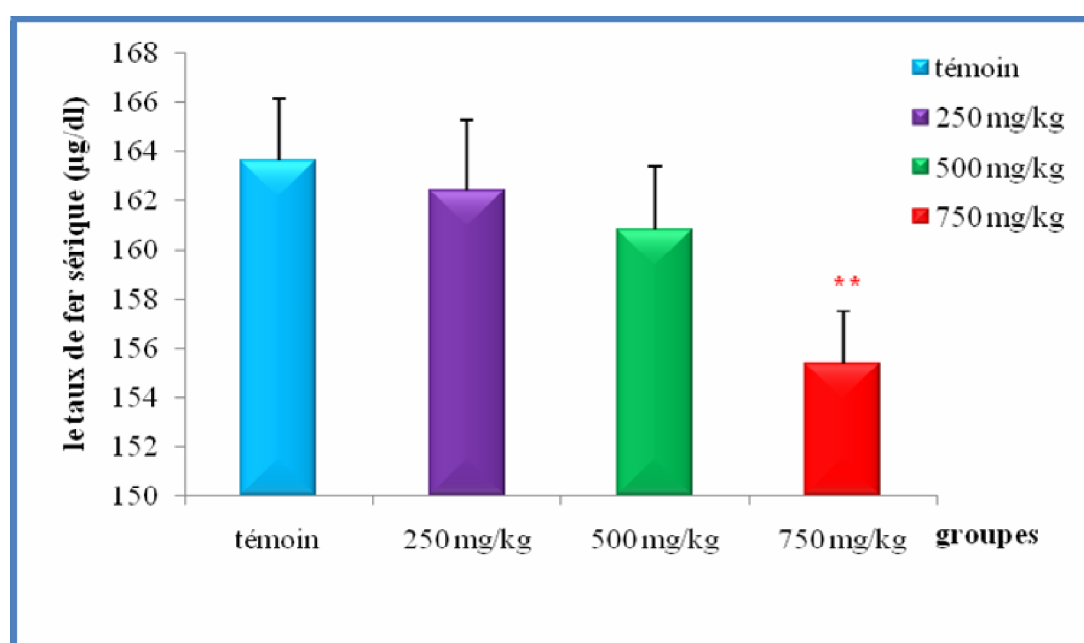
**Figures 23:** Taux plasmatique de la bilirubine totale chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

### 6.9. Taux plasmatique du fer sérique

Les données des taux du fer sériques chez tous les animaux sont représentées sur la Figure 24.

En comparant les groupes traités au témoin, il n'y a aucune différence significative ( $P \geq 0.05$ ) chez les groupes DI et DII. Cependant, la diminution est hautement significative ( $P \leq 0.01$ ) chez les animaux traités avec 750 mg/kg/j du DBP versus témoin.



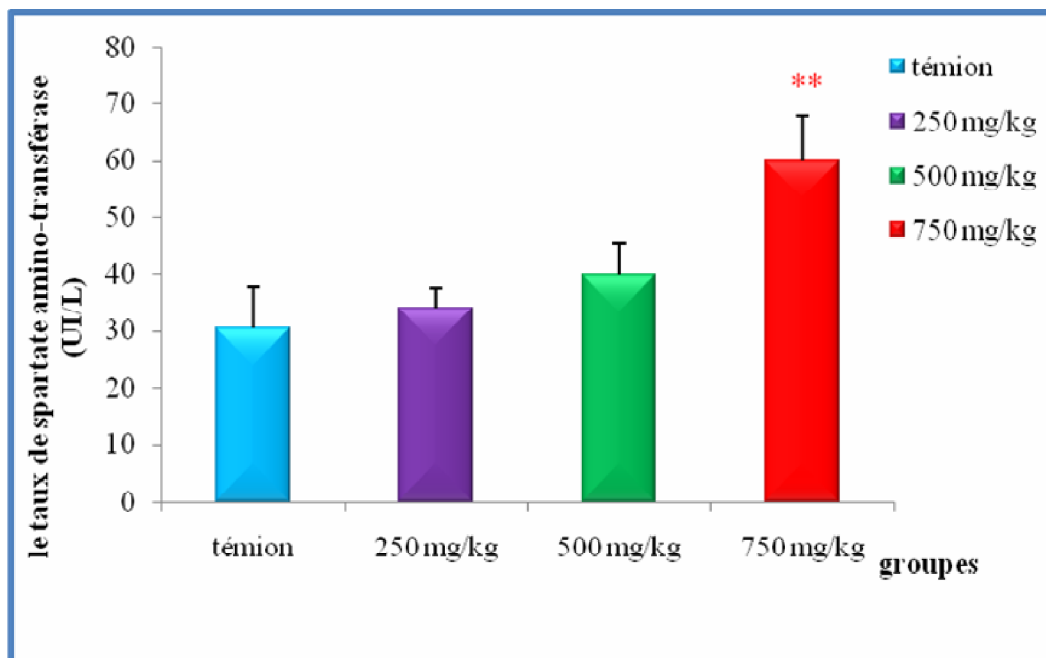
**Figures 24:** Taux plasmatique du fer sérique chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification :

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

### 6.10. Taux sérique d'Aspartate-Aminotransférase (ASAT/TGO)

Les résultats du dosage enzymatique de l'enzyme AST chez les groupes traités et le groupe témoin après 4 semaines expérimentales sont présentés dans la Figure 25.

L'analyse des données a montré une différence hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) du taux sérique d'AST chez le groupe DIII versus témoin.



**Figures 25:** Taux sérique d'Aspartate-Aminotransférase chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification:

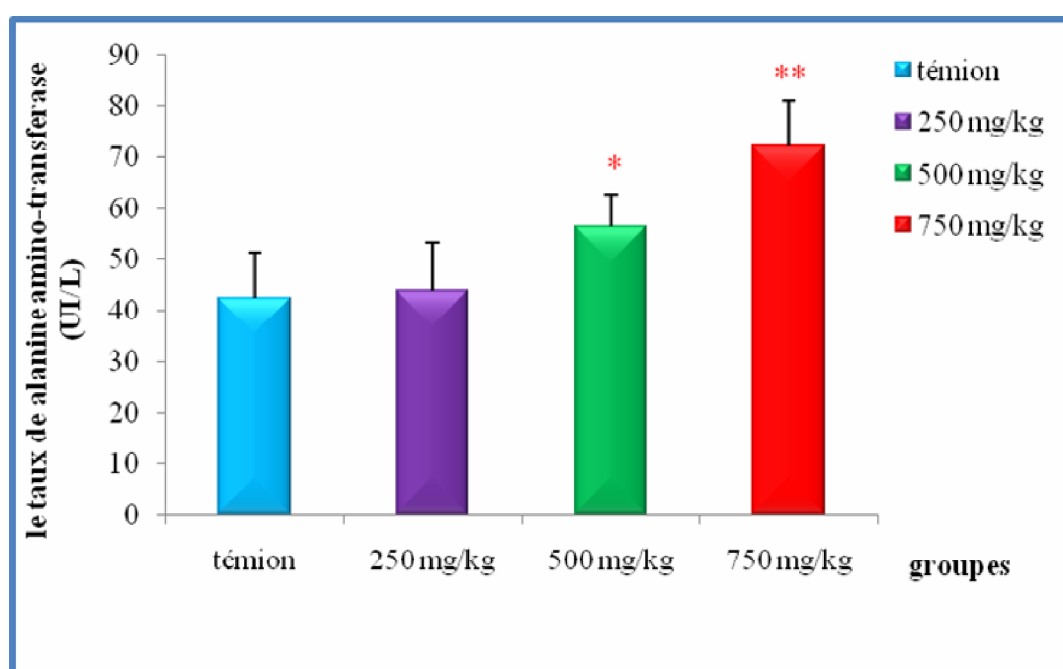
\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

### 6.11. Taux sérique de l'Alanine-Aminotransférase (ALAT/GPT)

Le détail des résultats du dosage enzymatique de l'enzyme ALT chez tous les groupes pendant les 4 semaines expérimentales sont présentés dans la Figure 26.

Les résultats obtenus montrent une augmentation significative ( $P \leq 0.05$ ) du taux d'ALT dans le sérum du groupe traité avec 500 mg/kg/j du DBP versus au groupe témoin.

Et une augmentation hautement significative ( $P \leq 0.01$ ) du taux d'ALT dans le sérum du groupe traité avec 750 mg/kg/j du DBP versus au groupe témoin

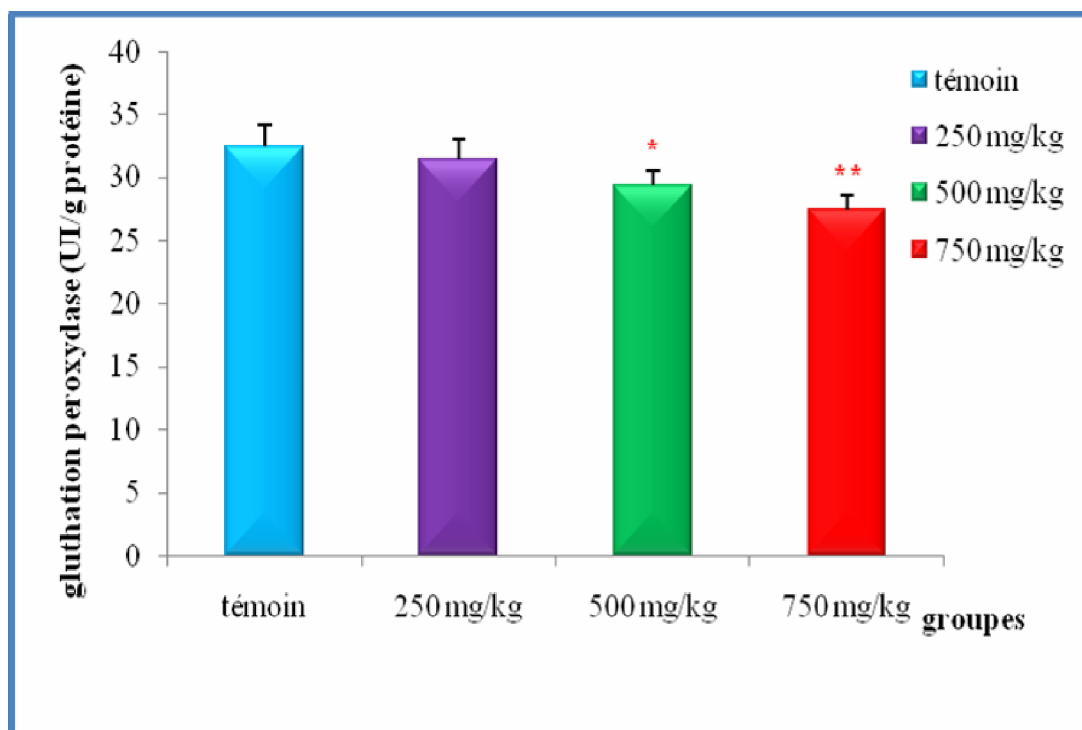


**Figures 26:** Taux sérique d'Alanine-Aminotransférase chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification:

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

### 6.12. Taux du glutathion peroxydase (GSH-px)

Les résultats obtenus montrent une diminution significative ( $P \leq 0.05$ ) du taux de GSH-px dans l'épididyme des lapins traité avec 500 mg/kg/j du DBP et une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) du taux de GSH-px chez les lapins traité avec 750 mg/kg/j du DBP par rapport au groupe témoin. Voir Figure 27.



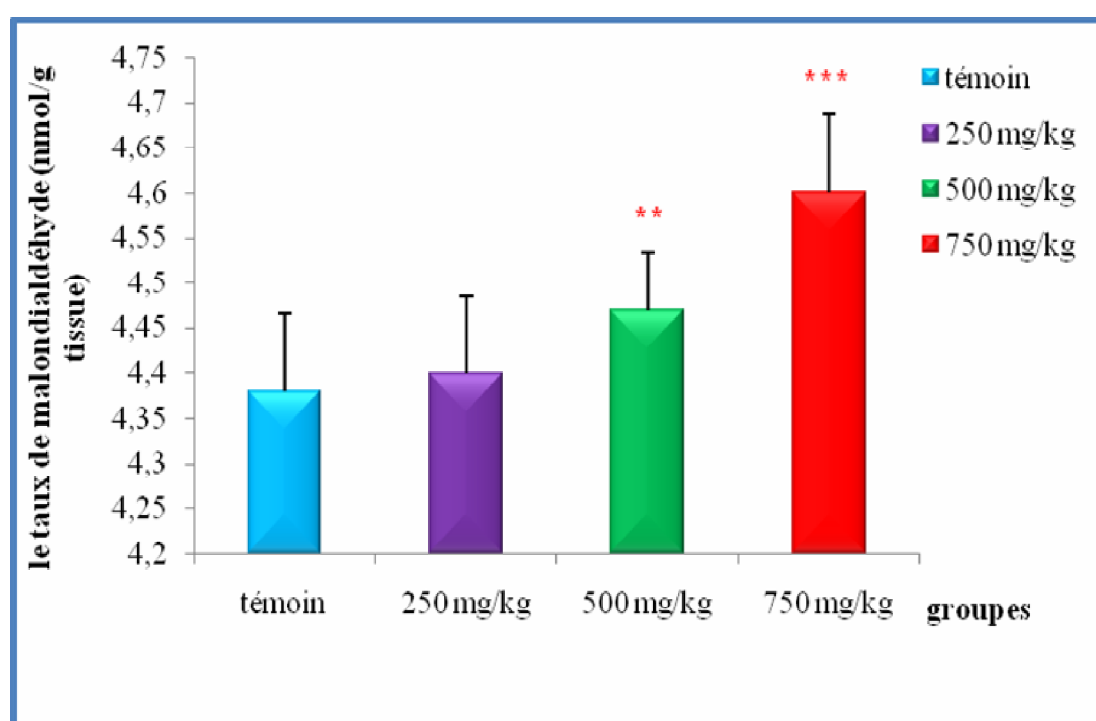
**Figures 27:** Taux du GSH-px épидидymaire chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification:

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

### 6.13. Taux du malondialdéhyde (MDA)

Les résultats du dosage du MDA dans l'épididyme chez les lapins après les 4 semaines expérimentales sont présentés à la Figure 28.

Comparés aux témoins, aucune différence significative n'a été enregistrée au niveau du groupe DI. Par contre cette différence est hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) et très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) dans les groupes DII et DIII respectivement.



**Figures 28:** Taux du MDA épидидymaire chez les lapins témoins et traités par trois doses du DBP pendant 4 semaines expérimentales ( $M \pm SE$ ,  $n=6$  ; Degrés de signification:

\*  $P \leq 0.05$ . \*\*  $P \leq 0.01$ . \*\*\*  $P \leq 0.001$ ).

## 7. Etude histologique

### 7.1. Etude histologique des testicules

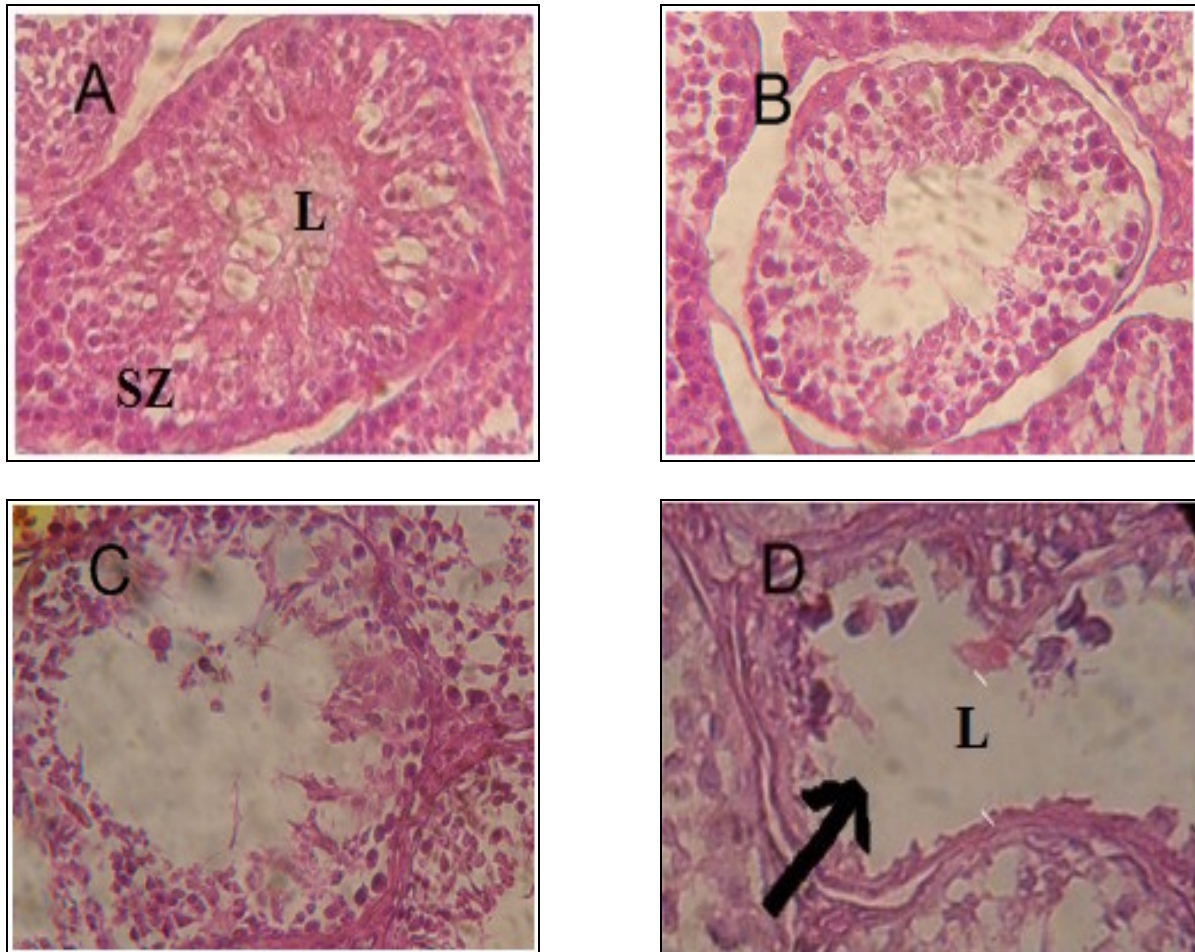
L'examen microscopique des coupes histologiques des testicules chez les lapins témoins et traités sont présentés dans la Figure 29.

D'après les résultats obtenus, l'examen microscopique des coupes histologiques de testicules chez les lapins témoins (photomicrographie A), révèle une spermatogenèse d'aspect normale. On remarque la présence des différents stades de la spermatogenèse, des spermatogonies aux spermatozoïdes matures. Les tubes séminifères ont un diamètre typique normal, avec un épithélium normal et une lumière remplie par les spermatozoïdes.

Par contre les coupes histologiques des testicules chez les lapins traités présentent d'une part, dans certains endroits, une structure tissulaire normale et d'autre part, la totalité des testicules montrent, des altérations tissulaires variées entre dégénérescence modéré et sévère des tubes séminifères.

Il faut dire que la lumière des tubes est pauvre en spermatozoïdes.

Cependant, les tubes séminifères des animaux traités par la dose la plus élevée deviennent atrophiques, caractérisées par d'une part une perte sévère des gamètes dans leur lumière et d'autre part par des cellules germinales desquamées. L'espace intercellulaire large, résulte de la destruction des cellules *de Sertoli* et une perturbation de la spermatogénèse. En conséquence, on a observé une abondance du tissu conjonctif entre les tubes séminifères, accompagnée par une congestion des vaisseaux sanguins et réduction du nombre des cellules *de Leydig*.



**Figure 29:** Coupes histologiques des testicules pour les différents groupes (témoin et traités). Les microphotographies ont été prises au grossissement X400 par la coloration de l'Hématoxyline et Eosine. (A) Les lapins témoins ont révélé un arrangement compact et régulier des cellules germinales dans les tubes séminifères. (B) Tubes séminifères des lapins traités avec 250 mg/kg du DBP ont montré une vacuolisation des cellules *de Sertoli*. (C) Les tubes séminifères des lapins traités avec 500 mg/kg du DBP ont montré une disposition irrégulière des cellules germinales avec absence des spermatocytes. (D) Les lapins traités avec 750 mg/kg du DBP montrent une réduction du diamètre et une dégénérescence des tubes séminifères (ST) avec nécrose des spermatocytes et spermatides, ainsi qu'une défoliation de nombreux spermatocytes dans la lumière (L) de la ST (flèche foncée).

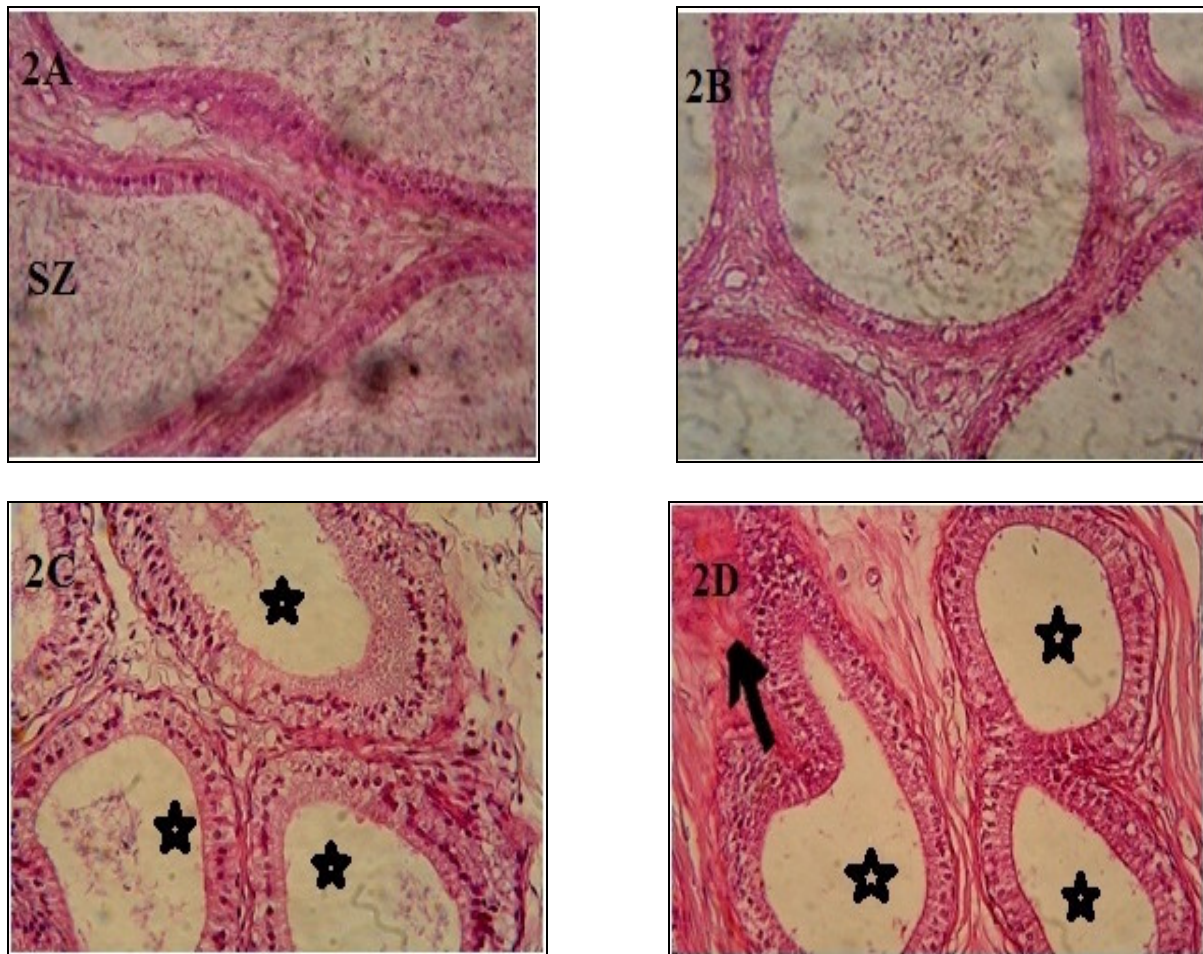
## **7.2. Etude histologique de l'épididyme**

L'évaluation histologique de l'épididyme chez les groupes témoins et traités par les doses (250, 500, 750 mg/kg/j) du DBP est motionnée à la Figure 30.

L'épididyme est un organe accolé au testicule, formé d'un très long tube épithélial, fortement contourné, qui met en communication, le testicule en amont et le canal déférent en aval. Du point de vue fonctionnel, il est désormais bien connu que l'épididyme est impliqué dans le transport, la maturation et le stockage (dans sa partie terminale ou queue) des spermatozoïdes (**Orgebin-Crist, 1975 ; Hinton BT, 1995**).

La photomicrographie (2A) montre une coupe histologique de l'épididyme chez le groupe témoin. De la photomicrographie, on observe un canal épидидymaire doublé extérieurement par un tissu conjonctif et une couche de cellules musculaires lisses. Cette couche de cellule est caractérisée en générale par une lumière large remplie par une abondante couche de spermatozoïdes matures.

Par rapport au groupe témoin, aucune modification majeure n'a été observée sur la morphologie de l'épididyme chez les lapins du groupe DI (2B). Cependant, des changements histologiques importants ont été observés dans l'épididyme des lapins du groupe DII et DIII. Les principaux changements pathologiques sont représentés par, une atrophie des tubes épидидymaires (2C et 2D), une hyperémie des vaisseaux interstitiels (2C). Enfin, la lumière des tubes épидидymaires est oligospermiques (2C et 2D).



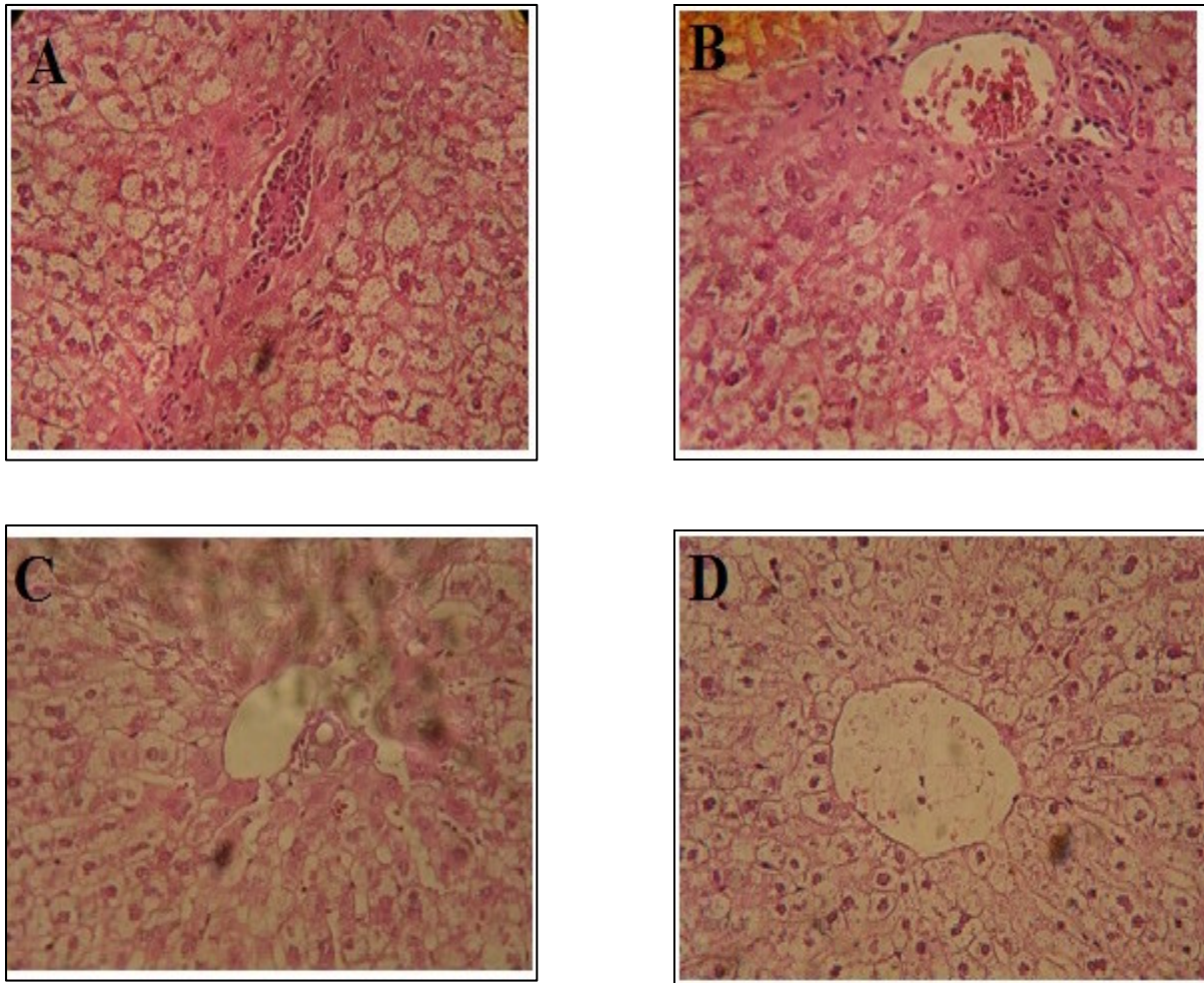
**Figure 30:** Coupes histologiques de l'épididyme chez les différents groupes (témoins et traités). Les microphotographies ont été prises à grossissement X400, coloration à hématoxyline et éosine. 2A. Epididyme du groupe témoin. 2B. L'épididyme des lapins traités avec 250 mg/kg du DBP, ne montre aucune modification morphologique importante. 2C. L'épididyme des lapins traité avec 500 mg/kg du DBP, montre la présence d'une atrophie des tubes épидидymaire et la lumière des tubes épидидymaires est oligospermique (étoiles 2C). 2D. L'épididyme des lapins traité avec 750 mg/kg du DBP, montre une hyperémie du tissu vasculaire interstitiel (flèche) et la lumière des tubes épидидymaires est plutôt oligospermique (étoiles).

### **7.3. Etude histologique du foie**

L'évaluation histologique du foie chez les animaux témoins et traités par les doses (250, 500, 750 mg/kg/j) du DBP est motionnée à la figure 31.

Le foie est constitué par des cellules appelé hépatocytes, qui forme des lames aplaties, anastomosées, constituée habituellement par 2 couches cellulaire. C'est le cas chez le groupe témoins (photomicrographie A).

Les observations microscopiques du foie des lapins traités au DBP (C, D) révèlent une modification cellulaire bien visible versus témoin, traduite par une vacuolisation des hépatocytes ainsi que le phénomène de nécrose hépatocytaire.



**Figure 31:** Coupes histologiques du foie chez les lapins témoins et traités pendant les 4 semaines expérimentales. Les photomicrographies ont été prises à grossissement de X400 par une coloration d'hématoxyline et éosine. Sur la Figures A et B, aucun changement de signes de lésion hépatique dans le groupe témoin et le groupe traité à la dose de 250 mg/kg/j du DBP. Sur la Figures C et D, la note de la fibrose, superficie accrue de vacuolisation et lésion tissulaire dans les échantillons de foie à partir des groupes traités (500 et 750 mg/kg/j) du DBP.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

#### IV-PARTIE DISCUSSION

Il y en a des comportements dans la vie de l'Homme, qui sont susceptibles d'entraîner des séquelles sur le plan physiologique et comportemental. Cela a été observé chez certaines franges de la population humaine, notamment sur celui de la reproduction. Depuis des dizaines d'années et à la suite d'une diminution dans le taux de fertilité observé notamment dans les pays industrialisés, des études ont été effectuées, dans le but est d'en savoir plus sur les effets des polluants.

Le DBP qui est un perturbateur endocrinien de l'environnement, représente une menace sur la fonction de la reproduction masculine. La toxicité du DBP sur la fertilité a été étudiée chez les différents modèles des animaux notamment chez les rongeurs. Ces études ont pris en considération la période d'exposition au DBP (**Muczynki, 2011**). Il faut savoir que les facteurs influençant la fonction de la reproduction sont multiples. Nous décrivons brièvement quelques-uns (facteurs génétiques, facteurs environnementaux, facteurs physiopathologiques).

De ce faite, il nous a semblé important d'envisager d'explorer les effets du DBP à différentes doses chez un modèle de laboratoire, le lapin domestique, *Oryctolagus cuniculus*. La littérature scientifique révèle une relation de cause à effet entre les polluants et baisse de la fertilité. Le DBP, produit chimique d'excellence, peut être exposée essentiellement chez l'Homme par voie orale (**Kohn et al., 2000**). Puisque il est ainsi, dans ce présent travail, l'exposition des lapins au DBP se faisait par gavage pendant 4 semaines de suite selon trois doses différentes 250, 500 et 750 mg/kg/j. Cependant, il convient de dire que les doses utilisées dans notre étude sont plus élevées que les niveaux trouvés dans l'environnement en général. Mais, comme le DBP à un caractère lipophile, cela pourraient entraîner son accumulation dans le corps à des doses élevées.

L'objectif principal de cette étude, était d'évaluer l'impact du DBP sur la fonction de la reproduction des lapins. Le deuxième objectif visait à identifier les effets de ce polluant sur certains paramètres hématologiques et biochimiques. L'hypothèse de notre travail, postulait que les animaux auraient des effets négatifs à la dose la plus élevée du DBP mais suggérait que les lapins développent certains symptômes d'infertilités avec les plus petites doses utilisées.

L'étude a permis de montrer à première vue, qu'aucun signe évident de toxicité chez les animaux n'a été observé tout au long de l'expérience. Cependant, les résultats ont montré une diminution du poids corporel chez le groupe traité avec 750 mg/kg/j du DBP versus témoin. Ceci est en accord avec les constatations de (Bibra, 1986; Gray *et al.*, 1982 et NTP, 1995). Cet effet, peut être expliqué par l'action du DBP sur le transport des éléments nutritifs (les acides aminés, le glucose, et les minéraux essentiels comme le zinc, magnésium et le fer...) par le sang et par conséquent, ils peuvent induire une mauvaise assimilation des aliments par le corps.

Plusieurs études ont évalué l'effet du DBP sur le poids corporel par voie orale chez les animaux. Une étude de Gray *et al.*, (1982), ont démontré chez les rats une réduction en gain de poids corporel mais seulement à doses très élevées (8000 mg/kg/j) et pendant une courte durée (7 jours). Par contre, une étude de Murakami *et al.*, (1986) chez les rats exposés à 34-36 jours, ont démontré que le poids corporel diminue même à des doses inférieures (250 mg/kg/j). Les auteurs d'une autre étude, notent une diminution en gain du poids corporel après une exposition répétée des rats à 720 mg/kg/jour pendant 13 semaines (NTP, 1995), et à 353 mg/kg/jour chez des souris exposées pendant la même période (NTP, 1995).

Un peu plus loin, l'administration de bis (2-éthylhexyle) phthalate chez les rats toujours par voie orale provoque une diminution en gain de la masse corporelle lorsque la

dose dépasse 625 mg/kg (**NTP, 1982**). Nos résultats semblent significatifs, puisque pas de gain en poids corporel mais une diminution significative a été observé chez le groupe traité avec la plus forte dose. Cette diminution est peut être due à l'effet du DBP sur le tractus gastro-intestinal entraînant une perte d'appétit ou un mal d'absorption des aliments provoquant ainsi une réduction dans la consommation d'aliment et d'eau chez les lapins.

En ce qui concerne le poids absolu des organes (foie et rein), des études ont montré que le DBP peut provoquer une augmentation du poids du foie, ainsi que des lésions hépatiques chez le rat mâle (**Marsman, 1995; Wine et al., 1997**). Cette augmentation s'accompagne d'une augmentation de l'activité du cytochrome de l'enzyme totale (CYP) P450 (**Walseth & Nilsen, 1986**). Dans notre étude, le poids absolu du foie et des reins augmentent aussi ce qui corrobore les résultats précédemment citées.

Des études de toxicologie ont montré que, l'administration orale du DBP entraîne une augmentation du poids des reins chez le rat (**ATSDR, 2001**). Par contre l'administration orale de forte dose à raison de 2600 mg/kg/jour du DBP chez des souris pendant une durée de 7 jours, entraîne une diminution du poids des reins (**Oishi & Hiraga, 1980**). Cependant, l'administration de 1,248 mg/kg/j du DBP chez les rats pendant une durée de 21 jours, provoque une augmentation du poids des reins (**BIBRA, 1986**).

L'**NTP en 1995** a examiné les effets du DBP sur le poids des reins chez les rats des deux sexes et aussi chez la souris femelle. Dans tous les cas, il y a eu augmentation du poids des reins quel que soit la dose et la période du traitement. En effet, une dose 359 et 712 mg/kg/jour du DBP pendant 13 semaines consécutives, a entraîné chez les rats mâles et femelles respectivement une augmentation de poids relatif des reins. De même, que chez la souris, la dose de 238 mg/kg/jour du DBP pendant 13 semaines, provoque la même

augmentation. Cette augmentation du poids absolu des reins chez les rats mâles et femelles et chez les souris mâles, est peut être expliquée par la diminution le poids corporelle.

Concernant le poids absolu des testicules et du l'épididyme, on a noté une diminution chez les animaux traités au 500 et 750 mg/kg/j du DBP par rapport au groupe témoin. Nos résultats rejoignent les études de **Srivastava et al., (1990)**, qui ont indiqué que l'administration du DBP à raison de 500 et 1000 mg/kg/j chez le rat mâle provoque une diminution du poids des testicules. Cette diminution serait peut être la cause dans l'observation d'atrophie et de lésion testiculaire.

**Foster et al., (1987)** ont étudié le rôle toxique du DBP par gavage sur les testicules. Ils ont trouvé qu'il entraîne la dégénérescence des tubes séminifères. Des études plus au moins récente, ont expliqué l'atrophie testiculaire par la diminution du diamètre des tubes séminifères et le diamètre nucléaire de cellules de *Leydig* (**Fabjan et al., 2006**).

Comme pour les testicules, le poids de l'épididyme diminue aussi mais sauf chez les animaux traités avec 750 mg/kg/j du DBP par rapport au groupe témoin. L'impact du DBP sur l'épididyme a été démontré également dans l'étude de **Fabjan et al., (2006)**. L'épididyme est largement dépendant de la masse des tubes épидидymaires et le nombre des spermatozoïdes. La réduction observée dans le poids de l'épididyme est peut être la cause d'une atrophie des tubes épидидymaires et la diminution du nombre de spermatozoïdes dans la lumière de ces dernières (**Fabjan et al., 2006**).

Sur le plan hématologique, on a remarqué que le nombre des globules rouges diminue. De même pour l'hémoglobine et la concentration de l'hématocrite. Dans la littérature scientifique, on trouve un lien entre les effets toxiques des phthalates sur les glandes génitales masculines et l'hémolyse des globules rouges. Selon les auteurs, la toxicité

testiculaire puisse être associée à une hypoxémie due à la diminution de l'hémoglobine sous l'effet toxique du MBP, le métabolite primaire du DBP (**Watanabe et al., 2002**).

Il a été démontré que, le MBP peut décomposer directement l'hémoglobine après avoir traversé la membrane des érythrocytes. Ce qui a amené à conclure que, le MBP peut réduire l'affinité de la liaison de l'hémoglobine avec l'oxygène ce qui provoquera l'anoxémie (**Fukuoka et al., 1993**). Par ailleurs, il est à noter que l'administration de doses élevées du DBP par la voie orale chez des rats et des souris, peut provoquer une anémie, ainsi qu'une diminution de l'hématocrite et de l'hémoglobine. Cela va ainsi réduire le niveau des globules rouges (**ATSDR, 2001**). La diminution des érythrocytes, hémoglobine, hématocrite ont été également observées chez les rats mâles traités par la voie orale à raison de 752 mg/kg/j du DBP (**Schilling et al., 1992**). L'hématocrite diminue aussi chez les souris femelles après administration de 2137 mg/kg/j du DBP par la voie orale (**NTP, 1995**).

Les résultats concernant le taux de fer sérique, montrent une diminution du taux de fer chez le groupe traité par 750 mg/kg/j du DBP versus témoin, cette diminution est probablement due à l'hémolyse qui affecte les globules rouges par la dégénérescence de l'hème en induisant une anémie.

Chez les humains et les animaux de laboratoire, l'évaluation des paramètres des spermatozoïdes est considérée comme un indicateur utile pour évaluer les effets toxiques des polluants environnementaux sur leur fonction testiculaire. Le présent travail montre, que l'administration du DBP chez le lapin domestique, par gavage selon les 3 doses utilisées et pendant une durée de 4 semaines provoque d'une part, une diminution dans la concentration, la mobilité, la vitesse et la vitalité des spermatozoïdes et d'autre part une altération tissulaire au niveau des testicules et au niveau de l'épididyme.

L'étude de **Zhou et al., (2011)** a démontré que l'exposition des rats au DBP provoque une diminution dans la mobilité et la concentration des spermatozoïdes chez le rat. De même pour la vitalité de ces cellules chez la même espèce (**Duty et al., 2003**). Ce qui est en concordance avec nos résultats. D'autres études ont révélé le caractère nocif du DBP sur les paramètres de reproduction chez le rat avec atrophie et lésion testiculaire (**Cater et al., 1977; Oishi and Hiraga, 1980; Gangolli, 1982; Gray et al., 1982; Fukuoka et al., 1989; Srivastava et al., 1990**).

La réduction observée dans le nombre des spermatozoïdes, semble être une conséquence d'une altération soit directement sur les cellules testiculaires soit indirectement via l'axe hypothalamo-hypophysaire, donc sur la cascade de ces hormones, GnRH, FSH-LH et testostérone.

L'effet du DBP sur la fonction testiculaire est tributaire de la dose et du temps d'administration. En effet, l'atrophie testiculaire chez les rats (diminution du poids des testicules, diminution du nombre spermatocytes et spermatogonies, et desquamation des cellules germinales) a été indiquée dont le traitement était de 1000 mg/kg/j du DBP pendant 5 jours (**Cater et al., 1977; Gray & Gangolli, 1986**), à 2400 mg/kg/j du DBP pour 7 jours par gavage (**Fukuoka et al., 1989, 1990**), ou à raison de 2100 mg/kg/j du DBP par gavage pendant 7 jours (**Oishi & Hiragi, 1980**), les résultats sont les mêmes, à savoir atrophie testiculaire.

**Gray et al., (1999)** ont constaté que, les rats traités à l'âge adulte avec 250 mg/kg/j, ont développé une atrophie testiculaire et une réduction dans la production des spermatozoïdes. De leur part, **Fukuoka et al., (1990)** ont montré que la perte des cellules germinales (spermatozoïdes, spermatides et spermatocytes) dans les tubes séminifères a été remarquée 6

heures après le début du traitement au DBP. Aussi une dissociation de ces cellules dans les tubes séminifères fut observé (**Fukuoka et al., 1990**).

Il est connu que les cellules *de Sertoli* ayant pour fonction, d'être un support du développement des cellules germinales. Cela peut expliquer la réduction du nombre des cellules germinales et leur vitalité observée durant l'âge adulte chez les rats. D'ailleurs, les travaux de **Boeklheide et al., (2011)** ont indiqué, que l'administration répétée du DBP par gavage provoque une diminution du nombre de cellules germinales. Cette diminution pourrait expliquer l'atrophie testiculaire observée chez nos lapins et également par une dissociation des cellules germinales des cellules *de Sertoli*. Chez les rats, l'aspect des cellules *de Sertoli* semble être touché par la présence du DBP, vu l'altération dans l'organisation de leur cytosquelettes, ce qui entraîne leur vacuolisation (**Fukuoka et al., 1989 ; ; Srivastava et al., 1990**). Il a été démontré, que les filaments de Vimentine de ces cellules sont touchés et altérés ce qui entraîne une réduction des cellules spermato-géniques (**Kleymenova et al., 2005**).

On peut dire que le DBP est toxique pour la reproduction chez plusieurs espèces animales dont le lapin. La spermatogénèse dépend des hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaires. Donc, le DBP agit négativement sur cette axe et donc sur la synthèse et la sécrétion de ces hormones.

Comme le taux plasmatique de la testostérone a diminué chez le lapin domestique adulte en présence du DBP. Par conséquent, les taux de LH et FSH diminuent eux aussi. Tous interviennent dans le bon déroulement de la spermatogénèse et l'inhibition de l'apoptose des cellules germinales (**Dohle et al., 2003 ; Zhou et al., 2010**).

On peut dire que c'est bien le changement dans le niveau plasmatique de LH et de FSH, est derrière l'altération de la fonction hypophysaire constaté chez le lapin mâle adulte.

Par, diminution du taux de la testostérone, modification des paramètres de la reproduction et aussi diminution du poids et morphologie des testicules et l'épididyme respectivement. En présence de quantité du DBP, le niveau plasmatique de l'inhibine est réduit, ça qui par conséquent réprime la sécrétion de la FSH. L'altération, puis la vacuolisation et enfin la réduction du nombre des cellules *de Sertoli*, provoque la réduction du nombre des cellules spermato-génique (**Lee et al., 2004**).

Autres études ont suggéré, que la diminution du nombre des spermatozoïdes est due à une perturbation de la spermatogénèse à cause de dysfonctionnement des enzymes testiculaires (**Ai-mei et al., 2011**).

**Xiaofeng et al., (2009)** ont démontré que l'administration du DBP par voie orale provoque une diminution de la testostérone ainsi qu'une diminution du métabolisme des hormones stéroïdiennes. On a trouvé dans la littérature scientifique que la diminution de la sécrétion de la LH aux niveau de la glande hypophysaire après traitement au DBP, est l'une des voies explications possible responsable dans la diminution du taux plasmatique de la testostérone (**Lee et al., 2004**).

Dans une étude consacré aux effets du DBP chez les poissons, il s'est avéré qu'il (DBP) peut exercer un effet anti-androgénique chez le poisson dont le système endocrinien est similaire à celui des mammifères (**Aoki et al., 2011**). Le mécanisme d'action anti-androgénique du DBP n'est pas lié au blocage des récepteurs androgéniques qui se trouve au niveau des cellules de *leydig*, mais plutôt à une diminution importante de la sécrétion de la testostérone (**Mylchreest et al., 2002**). Cette diminution peut être expliquée par une altération des cellules de *Leydig* et une perturbation significative dans leur capacité fonctionnelle (**Heng et al., 2011**).

Sur le plan biochimique, nos résultats ont montré une perturbation au niveau des paramètres biochimiques, notamment chez les groupes de lapins traités à raison de 500 et 750 mg/kg/j. L'analyse de nos résultats, montre une augmentation du taux sérique en protéine, albumine, glucose et en bilirubine. Par contre, le taux des triglycérides et du cholestérol diminuent. Ces variations peuvent être expliquées par l'effet du DBP sur l'activité des enzymes peptidase, protéase et lipases et certainement sur le métabolisme et la synthèse de ces paramètres. En effets, les phthalates appartiennent à une classe de substances chimiques qui sont proliférateurs de peroxysomes. L'exposition des organismes à ces produits chimiques évoque un ensemble de réponses qui incluent, une hypertrophie hépatocellulaire, hyperplasie et induction des enzymes métaboliques dans le foie des rongeurs (**Lock et al., 1989**).

Chez le rat adulte, l'administration la dose 353 mg/kg/j du DBP par gavage pendant 13 semaines, déclenche l'action enzymatique des peroxysomes (acyl-CoA oxydase) (**NTP, 1995**). Cette induction est derrière la diminution du taux de triglycéride et de cholestérol observée sous les conditions décrites en-dessus. Toujours chez le rat, des études ont montré, que la prolifération des peroxysomes et l'augmentation des enzymes peroxysomales dans les hépatocytes se produisait à des doses de 2131 mg/kg/j du DBP et cela pendant 21 jours (**BIBRA 1986; Murakami et al., 1986**).

La diminution du taux de triglycéride et de cholestérol observée durant notre étude, serait peut être associé à la prolifération des peroxysomes, comme révélé dans d'autres résultats réalisées notamment chez le rat. Cette réponse peut contribuer à l'augmentation du poids du foie (**Murakami et al., 1986**), chose observée chez nos groupes expérimentaux. Plus la dose est forte plus le poids du foie est en augmentation ; du probablement à une activité peroxysomales intenses.

**NTP, (1995)** ont rapporté que l'altération hépatocellulaires suivant à la déplétion en glycogène, chez les rats et les souris exposés à 720 et 1601 mg/kg/j, respectivement, chez les rats traités au DBP pendant 13 semaines. Ceci qui explique l'augmentation du taux plasmatique du glucose chez les lapins traités dans notre travail.

Dans notre étude biochimique, nous avons entrepris l'analyse aussi de la bilirubine. Il s'agit du pigment principal de la bile humaine. La bilirubine est formée à partir de la décomposition de l'hème. Le présent travail montre une augmentation du taux de bilirubine après administration du DBP (une durée de 30 jours). Le taux de bilirubine dans le sang peut augmenter pour deux raisons: soit à cause de la destruction des globules rouges, soit à cause d'un mauvais fonctionnement du foie qui ralentit son évacuation dans la bile (**NTP, 1995**).

Les bio-marqueurs les plus couramment employés pour déceler les lésions au foie (lésions hépatocellulaires) sont l'alanine-aminotransférase (ALT) et l'aspartate-aminotransférase (AST), que l'on appelait autrefois GPT et GOT. Ces enzymes sont normalement présentes dans les cellules du foie. Lorsque les hépatocytes sont endommagés, les enzymes s'en échappent et se retrouvent dans le sang. L'ALT est considéré comme un indicateur plus spécifique de l'inflammation du foie que l'AST, car ce dernier est aussi présent dans d'autres organes, par exemple le cœur ou les muscles squelettiques (**Klaassen & Watkin, 1984; Ronald & Koretz, 1992**).

En effet, l'étude histologique a montré une altération au niveau du foie, accompagnée d'une augmentation de taux des enzymes sériques, AST et ALT. On peut dire que l'effet du DBP a été d'emblée toxique sur le foie ce qui a engendré lésion cellulaire clairement révélées au niveau des coupes histologiques. Ces lésions sont peut être due à l'accumulation du DBP et les métabolites toxiques de la peroxydation lipidique qui déversent leurs contenus tels que les transaminases dans le sang.

En ce qui concerne le taux sérique en urée et en créatinine chez les lapins, nos résultats montrent une augmentation du taux de ces dernières chez les lapins versus témoins. Cette augmentation est accompagnée par une augmentation du poids des reins après gavage du DBP. L'urée et la créatinine, ce sont des paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (**Finco, 1997**). Alors, l'augmentation de ces deux paramètres dans notre étude peut être expliquée par une lésion tissulaire aux niveaux des reins chez les lapins traités au DBP.

Sous l'effet de plusieurs facteurs tel que l'absorption des xénobiotiques, l'organisme se trouve confronté à des attaques radicalaires massives qui conduisent à un affaiblissement progressif de ces défenses antioxydantes, et également à l'apparition d'importantes altérations cellulaires.

Le stress oxydant se trouve d'après la recherche scientifique comme un mécanisme possible de la toxicité (**Zhou et al., 2006**). Comme la membrane plasmique des spermatozoïdes riche en acides gras polyinsaturés (**Marchlewicz et al., 2004**), est très sensible à l'attaque des radicaux libres. En outre, l'épididyme riche en système de défense antioxydant, protège le sperme lors de son transit de la région de la queue de l'épididyme et facilite leur processus de maturation (**Vernet et al., 2004**). Toutefois, l'épididyme peut être sous un effet stressant dû à la présence du DBP. Ces résultats ont été révélés par nos données obtenues chez les lapins adultes. L'équilibre de pro-oxydant et antioxydant est indispensable pour le fonctionnement biologique normal des cellules et des tissus (**Aly et al., 2009**).

La GPx qui est une enzyme antioxydante clé, règle le niveau des radicaux libres (la GPx est capable de non seulement de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, mais aussi les hydroperoxydes résultants de l'oxydation des acides gras insaturés) et donc protège les cellules contre les dégâts générés par le DBP (**Fujii et al., 2003, Zhou et al., 2006**). Et d'après

nos résultats, on observe une diminution de l'activité de GPx dans l'épididyme chez les lapins traités par le DBP. Cette diminution est due principalement à une surproduction de peroxyde d'hydrogène et l'épuisement du sélénium et de GSH pour la détoxification du DBP (**Fujii et al., 2003, Zhou et al., 2006**). Ce qui entraîne une diminution de l'activité enzymatique de la GPx (GPx a besoin du glutathion et du sélénium pour fonctionner correctement) (**Nielson, 1995**).

L'effet du DBP sur l'activité de l'enzymes antioxydante (GPx), s'accompagne d'une augmentation de la quantité de radicaux libres, comme le radicale hydroxyle qui à leur tour peut initier la peroxydation lipidique (**Valko et al., 2006; Hansen et al., 2006**). En effet, nos résultats montrent une augmentation du taux de malondialdéhyde (MDA) qui est un biomarqueur de la peroxydation lipidique (**Favier, 1997; Bonnefont-Rousselot et al., 2003**) a été observée dans l'épididyme.

Nos résultats montrent, que le DBP a la capacité d'altérer le statut antioxydant dans l'épididyme chez les lapins traités, comprend la GSH-Px qui piègent les radicaux libres nuisibles dans les organes reproducteurs mâles. Cette altération est accompagnée de la peroxydation lipidique (**Fujii et al., 2003, Zhou et al., 2006**).

Le stress oxydant, s'il serait présent dans l'épididyme, il pourrait conduire à une quantité insuffisante du système de défense antioxydant pour protéger et les spermatozoïdes et les cellules épithéliales de l'épididyme. Car le système de défense antioxydant protège les cellules épithéliales de l'épididyme du risque d'une augmentation des niveaux de radicaux libres (**Marchlewicz et al., 2004**). L'augmentation de radicaux libres est le non bienveillant, puisqu'il diminue la motilité des spermatozoïdes en affectant la structure de l'axonème flagellaire. Cette altération de la motilité des spermatozoïdes est toutefois progressive (**EI-Taieb et al., 2009**).



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## **Conclusions générales et perspectives**

En conclusion, nos résultats montrent que l'administration du DBP aux trois doses à raison de 250, 500, 750 mg/kg/j par gavage chez les lapins mâles adultes pendant 4 semaines expérimentales, a provoqué des effets toxiques sur les paramètres hématologiques, biochimiques et sur les paramètres de la reproduction.

### En ce qui concerne la croissance corporelle

Nos résultats montrent :

- Une diminution du poids corporel durant la période du traitement.
- Une diminution des poids absolus des organes (testicules, épидидymes) chez les lapins traités par le DBP.
- Une augmentation des poids absolus des organes (foie, reins) chez les lapins traités par le DBP.

### En ce qui concerne la fonction de la reproduction

L'administration du DBP, provoque :

- Une diminution du nombre, de mobilité, de vitesse et de vitalité des spermatozoïdes. Ce qui montre l'effet toxique du DBP sur la fertilité chez le mâle.
- Une diminution du taux de la testostérone, ce qui confirme l'effet anti-androgénique de ce polluant.

### En ce qui concerne la fonction hématologique

L'administration du DBP, provoque :

- Une diminution du nombre de globules rouges (RG) et le taux de l'hématocrite.
- Une diminution du taux de l'hémoglobine.

### En ce qui concerne l'étude des paramètres biochimiques

Nos résultats montrent que le traitement par le DBP induit :

- Une augmentation de la concentration sérique en albumine, protéines totales, glucose et en bilirubine.
- Une diminution du taux plasmatique du cholestérol, triglycérides et du fer sérique.
- Une augmentation de la concentration plasmatique en glucose, urée et créatinine.
- Une augmentation de la concentration sérique des activités des enzymes sériques. (TGO et TGP), ce qui confirme l'effet hépatotoxique et néphrotoxique du DBP.

En ce qui concerne l'étude de quelques paramètres du stress oxydatif:

Nos résultats montrent que le traitement par le DBP induit :

- Une diminution de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase (GP<sub>x</sub>) au niveau de l'épididyme.
- Une augmentation significative des taux de peroxydation lipidique (MDA) au niveau de l'épididyme ce qui montre l'effet de ce composé chimique au niveau cet organe étudiés.

En ce qui concerne l'étude histologique :

- Une altération structurale des testicules et de l'épididyme avec une atrophie et une diminution du nombre de spermatozoïdes au sein des ces organes, ce qui confirme l'effet toxique de DBP sur les organes sexuelles masculines.
- Une altération structurale du foie avec une hyperplasie. En effet, nos résultats illustrent l'apparition des cytolyses hépatiques. Ceci témoigne de l'effet cytotoxique local de DBP sur les hépatocytes.

Les perspectives de notre travail sont encore nombreuses sur ce sujet. Il serait intéressant d'éclaircir l'effet de ce produit chez les deux sexes, en particulièrement au cours de l'activité sexuelles mâles et femelles et de la gestation, en utilisant d'autre techniques cellulaires et moléculaires pour mieux comprendre ces effets à l'échelle moléculaire.

Le dosage de plusieurs enzymes de stress oxydant dans les déférents organes (foie, reins, testicules...)

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## Les références :

### A

- Ai-mei, B., Xiao, M., Xue, J.G., Hui-bin, D., Fu-qiang, W., Hong S., Yu-Bang, W., Zuo-Min, Z. & Jia-Hao, S. (2011). Effects of di-n-butyl phthalate on male rat reproduction following pubertal exposure. *Asian Journal of Andrology*. 13, 702–709.
- Akingbemi, B.T., Youker, R.T., Sottas, C.M., Ge, R., Katz, E., Klinefelter, G.R., Zirkin, B.R. & Hardy, M.P. (2001). Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Biol Reprod*. 65, 1252-1259.
- Alam, M.S., Ohsako, S., Matsuwaki, T., Zhu, X.B., Tsunekawa, N., Kanai, Y., Sone, H., Tohyama, C. & Kurohmaru, M. (2010). Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: a possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reproduction*. 139, 427-437.
- Albro, P.W., Corbett, J.T., Schroeder, J.L., Jordan, S. & Matthews, H.B. (1982). Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ. Health. Perspect*. 45, 19-25.
- Aly, H.A., Domenech, O., & Abdelnaim, A.B. (2009). Aroclor 1254 impairs spermatogenesis and induces oxidative stress in rat testicular mitochondria. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 1733–1738.
- Anderson, W.A., Castle, L., Scotter, M.J., Massey, R.C., Springall, C.A. (2001). Biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. *Food. Addit. Contam*. 18 (12), 1068-1074.
- Aoki, K.A., Harris, C.A., Katsiadaki, & Sumpter, J.P. (2011). Evidence suggesting that di-n-butyl phthalate has anti-androgenic effects in fish. *Environ. Toxicol. Chem*. Feb 19.
- Astill, B.D. (1989). Metabolism of DEHP: effects of prefeeding and dose variation, and comparative studies in rodents and the cynomolgus monkey (CMA studies). *Drug. Metab. Rev*. 21, 35-53.
- ATSDR. (2001). Toxicological Profile for di-n-butyl phthalate.

**-Auharek, S.A., De Franca, L.R., McKinnell, C., Jobling, M. S., Scott, H. M. & Sharpe, R.M.** (2010). Prenatal plus postnatal exposure to Di (n-Butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final Sertoli cell number in the rat. *Endocrinology*. 151, 2868-2875.

**B**

---

**-Bergmyer & Horder.** (1980). *Clin. Chem. Acta*. 105: 147.

**-Bibra.** (1986). Effects of the DBP on the liver and liver lipids. Report to Chemical Manufacturers Association. *The British Industrial Biological Research Association*. P. 28.

**-Blount, B.C., Manori J.S., Caudill, S.P., Needham, L.L., Pirkle, J.L., Sampson, E.J., Lucier, G.W., Jackson, R.J., Brock, J.W.** (2000). Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ. Health Perspect.* 108 (10), 979-982.

**-Boekelheide, K., Kleymenova, E., Liu, K., Swanson, C. & Gaido, K. W.** (2009). Dose-dependent effects on cell proliferation, seminiferous tubules, and male germ cells in the fetal rat testis following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Microsc. Res. Tech.* 72, 629-638

**-Boekelheide, K., Johnson, K.J., Richburg, J.H.** (2011). Sertoli Cell Toxicants. In: M.K. Skinner, Griswold (eds), *Sertoli Cell Biology*. San Diego: Elsevier Academic. P. 1-115.

**-Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., Beaudeau, J.L., Peynet, J., Legrand, A., Delattre, J.** (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels. *Ann. Biol. Clin.* 59(4), 453-459.

**-Borch, J., Metzdorff, S.B., Vinggaard, A.M., Brokken, L. & Dalgaard, M.** (2006). Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology*. 223, 144-155.

**-Bornehag, C.G., Lundgren, B., Weschler, C.J., Sigsgaard, T., Hagerhed-Engman, L. & Sundell, J.** (2005). Phthalates in indoor dust and their association with building characteristics. *Environ. Health Perspect.* 113, 1399-1404.

**-Burtis,** (1999). Tietz textbook of clinical chemistry, 3<sup>rd</sup> ed AACCC.

## C

- 
- Calafat, A. M. & McKee, R.H.** (2006). Integrating biomonitoring exposure data into the risk assessment process: phthalates [diethyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate] as a case study. *Environ. Health Perspect.* 114, 1783-1789.
- Chauvigne, F., Menuet, A., Lesne, L., Chagnon, M.C., Chevrier, C., Regnier, J.F., Angerer, J. & Jegou, B.** (2009). Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis *in vitro*. *Environ. Health Perspect.* 117, 515-521.
- Christiansen, S., Boberg, J., Axelstad, M., Dalgaard, M., Vinggaard, A.M., Metzdorff, S.B. & Hass, U.** (2010). Low-dose perinatal exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate induces anti-androgenic effects in male rats. *Reprod. Toxicol.* 30, 313-321.
- Clausen, P.A., Hansen, V., Gunnarsen, L., Afshari, A. & Wolkoff, P.** (2004). Emission of di-2-ethylhexyl phthalate from PVC flooring into air and uptake in dust: emission and sorption experiments in FLEC and CLIMPAQ. *Environ. Sci. Technol.* 38, 2531-2537.
- CMA.** (1999). Comments of the Chemical Manufacturers Association phthalate esters panel in response to request for public input on seven phthalate esters. FR Doc. 99-9484. Washington, DC: Chemical Manufacturers Association.
- Culty, M., Thuillier, R., Li, W., Wang, Y., Martinez-Arguelles, D.B., Benjamin, C.G., Triantafilou, K. M., Zirkin, B. R. and Papadopoulos, V.** (2008). *In utero* exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. *Biol. Reprod.* 78, 1018-1028.

## D

- 
- Damstra, T., Barlow, L., Bergman, A.** (2002). International Programme on Chemical Safety. eds. Global Assessment of the state-of-the-science of endocrine disrupting chemicals.
- Davis, B.J., Maronpot, R.R. & Heindel, J.J.** (1994). Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 128, 216-223.

- Delbès, G., Levacher, C. & Habert, R.** (2006). Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction*. Vol. 132, No. 4, (October 2006), pp. 527-538.
- De Rooij, D.G.** (1998). Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology*. 79 67–80.
- Dohle, G.R., Smit, M., Weber, R.F.** (2003). Androgens and male fertility. *World Journal of Urology*. 21, 341–345.
- Drupt, F.** (1974). Dosage de l'albumine sérique par le vert de bromocrésol. *Pharm. biol.* 9, 777.
- Duty, S.M., Silva, M.J., Barr, D.B., Brock, J.W., Ryan L., Chen. Z., Herrick, R.F., Christiani, D.C. & Hauser, R.** (2003). The relationship between environmental exposure to phthalates and human semen parameters. *Epidemiology*. 14, 269–277.

## E

---

- Ema, M. & Miyawaki, E.** (2001). Effects of monobutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod. Toxicol.* 15, 261-267.
- EI-Taieb, M.A., Herwig, R., Nada, E.A., Greiberger, J., & Marberger, M.** (2009). Oxidative stress and epididymal sperm transport, motility and morphological defects. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*. 144: 199–203.

## F

---

- Fabjan, E., Hulzebos, E., Mennes, W., Piersm, A.H.** (2006). A category approach for reproductive effects of phthalates. *Toxicol.* 36, 695–726.
- Fang, H., Tong, W., Branham, W.S., Moland, C.L., Dial, S.L., Hong, H., Sheehan, D.M.** (2003). Study of 202 Natural, Synthetic, and Environmental Chemicals for Binding to the Androgen Receptor. *Chem. Res. Toxicol.* 16 (10), 1338–1358.
- Favier, A.** (1997). Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann. Biol. Clin.* 55 (1), 9-16.

- Fennell, C.W., Lindsey, K.L., McGaw, L.J., Sparg, L.G., Stafford, G.I. Elgorashi, E.E., Grace, O.M. & Staden, J.** (2004). Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. *J. Ethnopharmacol.* 94, 205-217.
- Ferrara, D., Hallmark, N., Scott, H., Brown, R., McKinnell, C., Mahood, I.K. & Sharpe, R.M.** (2006). Acute and long-term effects of *in utero* exposure of rats to di (n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology.* 147, 5352-5362.
- Finco, D.R.** (1997). Kidney function. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruce, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* Academic press, San Diego, California. 462- 478.
- Fisher, J.S., Macpherson, S., Marchetti, N. & Sharpe, R.M.** (2003). Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using *in-utero* exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum. Reprod.* 18, 1383-1394.
- Foster P.M.D., Foster J.R., Cook M.W., Thomas L.V., Gangolli S.D.** (1982). Changes in ultrastructure and cytochemical localization of zinc in rat testis following the administration of di-n-pentyl phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63,120-132.
- Foster, P.M.** (2006). Disruption of reproductive development in male rat offspring following *in utero* exposure to phthalate esters. *Int. J. Androl.* 29, 140-147.
- Foster, P.M.D., Lake, B.G., Cook, M.W., Thomas, L.V., & Gangolli, S.D.** (1987). Studies on the testicular effects produced by various isomers of mono-n-butyl-o-phthalate in the rat. *Chem. Biol. Interact.* 34, 233-238.
- Flohe, L., Gunzler, W.A.** (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114–121.
- Frederiksen, H., Skakkebaek, N.E. & Andersson, A.M.** (2007). Metabolism of phthalates in humans. *Mol. Nutr. Food. Res.* 51, 899-911.
- Fromme, H., Lahrz, T., Piloty, M., Gebhart, H., Oddoy, A. & Ruden, H.** (2004). Occurrence of phthalates and musk fragrances in indoor air and dust from apartments and kindergartens in Berlin (Germany). *Indoor Air.* 14, 188-195.

**-Fujii, J., Luchi, Y., Matsuki, S., & Ishii, T.** (2003). Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissue. *Asian Journal of Andrology*. 5, 231–242.

**-Fukuoka, M., Kobayashi, T., Zhou, Y., & Hayakawa, T.** (1993). Mechanism of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats, Part 4, Changes in the activity of succinate dehydrogenase and the levels of transferrin and ferritin in the Sertoli and germ cells. *Journal of Application Toxicology*. 13, 241-246.

**-Fukuoka, M., Tanimoto, T., Zhou, Y., Kawasaki, N., Tanaka, A., Ikemoto, I. & Machida, T.** (1989). Mechanism of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats. *J. Appl. Toxicol.* 9, 277–283.

## G

---

**-Gabe, M.** (1968). Techniques histologiques. *Masson et Cie*, Paris. p: 1113.

**-Gaido, K.W., Hensley, J.B., Liu, D., Wallace, D.G., Borghoff, S., Johnson, K.J., Hall, S.J. & Boekelheide, K.** (2007). Fetal mouse phthalate exposure shows that Gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci.* 97, 491-503.

**-Gamer, A.O., Leibold, E., Mellert, W., Deckardt, K., Kittel, B., Hildebrand, B.** (2000). Di-n-butyl phthalate subacute inhalation study in Wistar rats. 20 exposures as a liquid aerosol. Project No. 40I0486/98063. BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen, Germany.

**-Gray, L.E., Laskey, J. and Ostby, J.** (2006). Chronic di-n-butyl phthalate exposure in rats reduces fertility and alters ovarian function during pregnancy in female Long Evans hooded rats. *Toxicol Sci.* 93, 189-195.

**-Gray, T.J., Rowland, I.R., Foster, P.M. & Gangolli, S.D.** (1982). Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicology Letters*. 11, 141–147.

**-Greenough, P.R., Maccallum, F.J. & Weaver, A.D.** (1981). Lameness in Cattle 2nd edn. Bristol, UK: John Wright & Sons.

---

**Gwinn, M.R., Whipkey, D.L., Tennant, L.B., & Weston, A.** (2007). Gene expression profiling of dibutyl phthalate in normal human mammary epithelial cells. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*. 26 (1), 5161.

## H

---

**-Hansen, B.H., Romma, S., Garmo, O.A., Olsvik, P.O., Andersen, R.A.** (2006). Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers.

**-Harris, C.A., Henttu, P., Parker, M. G. & Sumpter, J.P.** (1997). The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect*. 105, 802-811.

**-Hauser, R., Duty, S., Godfrey-Bailey, L. & Calafat, A.M.** (2004). Medications as a source of human exposure to phthalates. *Environ Health Perspect*. 112, 751-753.

**-Huang, P.C., Kuo, P.L., Guo, Y.L., Liao, P.C. & Lee, C.C.** (2007). Associations between urinary phthalate monoesters and thyroid hormones in pregnant women. *Hum Reprod*. 22, 2715-2722.

**-Heindel, J.J. & Powell, C.J.** (1992). Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function in vitro: effects of phthalate side chain and age of animal. *Toxicol Appl Pharmacol*. 115, 116-123.

**-Heng, K., Anand-ivell, R., Teerds, K., Ivell, R.** (2011). The endocrine disruptor's dibutyl phthalate (DBP) and diethylstilbestrol (DES) influence Leydig cell regeneration following ethane dimethane sulphonate treatment of adult male rats. *Int J Androl*.

**-Henley J, Huang K, Wang D, Poo M.** (2004). Calcium mediates bidirectional growth cone turning induced by myelin-associated glycoprotein. *Neuron*. 44: 909–16.

**-Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V. & Angerer, J.** (2007). Phthalates: toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health*. 210, 623-634.

**-Hines, C., Nilsen Hopf, N., Deddens, J., Calafat, A., Silva, M., Grote, A., & Sammons, D.** (2009). Urinary phthalate metabolite concentrations among workers in selected industries: A pilot biomonitoring study. *Ann Occup Hyg*. 53, 1–17.

**-Hinton, B.T., Palladino, M.A., Rudolph, D., Labus, J.C.** (1995). The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod Fertil.* 7, 731- 43.

**-Howdeshell, K.L., Rider, C.V., Wilson, V.S. & Gray, L.E.** (2008). Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environ Res.* 108, 168-176.

## I

---

**-Imajima, T., Shono, T., Zakaria, O., & Suita, S.** (1997). Prenatal phthalate causes cryptorchidism postnatally by inducing transabdominal ascent of the testis in fetal rats. *J. Pediat Sgry.* 32, 18–21.

**-INRS.** (2003). fiche toxicologique N°98. Cahier de notes documentaire. Hygiène et sécurité du travail. 192, 73-78.

**-IPCS (International Programme on Chemical Safety).** (1997). Environmental Health Criteria 131 Di-n-butyl phthalate, Organisation mondiale de la santé, Genève. p.205.

## J

---

**-Jaakkola, J.J.K., Knight, T.L.** (2008). The role of exposure to phthalates from polyvinyl chloride products in the development of asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* 116 (7), 845-853.

**-Janjua, N.R.** (2008). Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. *Environmental Science & Technology.* 15, 5564-70.

**-Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G. & Sumpter, J.P.** (1995). A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect.* 103, 582-587.

## K

---

**-Kaplan, L.A.** (1984). Glucose. Kaplan A. *et al.*, Clin chem. The C.V. mosby Co. Si louis.Tronto. Princeton. 1032-1036.

- Kaplan, L.A.** (1984). Urea. Kaplan A et al .Clin chem. The C.V. mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton. pp: 1257-1260.
- Kaplan, L.A.** (1984). Bilirubine. Kaplan A et al .Clin chem. The C.V. Mosby Co. Si louis.Tronto. Princeton. pp: 1238-1241.
- Kato, K., Silva, M.J., Reidy, J.A.** (2003). Mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect.* 112, 327-330.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C.** (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect.* 4, 715-740.
- Kawano, M.** (1980). Toxicological studies on phthalate esters: metabolism, and excretion of phthalate esters in rats. *Nippon Eiseigaku Zasshi (Jpn. J. Hyg.).* 35, 693-701.
- Kleinsasser, N.H., Gamarra, F., Bergner, A., Wallner, B.C., Harréus, U. A., Juchhoff, J., Kastenbauer, E.R., & Huber, R.M.** (2001). Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay. *ORL.* 63, 141–147.
- Klymenova, E., Swanson, C., Boekelheide, K. & Gaido, K.W.** (2005). Exposure *in utero* to di (n-butyl) phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat Sertoli cells and disrupts Sertoli cell-gonocyte contact. *Biol Reprod.* 73, 482-490.
- Kohn, M.C., Parham, F., Masten, S.A., Portier, C.J., Shelby, M.D., Brock, J.W., Needham, L.L.** (2000). Human exposure estimates for phthalates. *Environmental Health Perspective.* 108, 440–442.
- Koike, E., Inoue, K., Yanagisawa, R. & Takano, H.** (2009). Di-(2-ethylhexyl) phthalate affects immune cells from atopic prone mice *in vitro*. *Toxicology.* 259, 54-60.
- Koo, H.J. & Lee, B.M.** (2004). Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 67, 1901-1914.
- Kleinsasser, N.H., Wallner, B.C., Kastenbauer, E.R., Weissacher, H., & Harreus, U.A.**

(2001). Genotoxicity of di-butyl-phthalate and di-iso-butyl-phthalate in human lymphocytes and mucosal cells. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. 21, 189-196.

## L

---

**-Lake, B.G., Gangolli, S.D., Grasso, P. & Lloyd, A.G.** (1975). Studies on the hepatic effects of orally administered (di-2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 32, 355-367.

**-Larsen, S.T. & Nielsen, G.D.** (2008). Structure-activity relationship of immunostimulatory effects of phthalates. *BMC Immunol*. 9, 61

**-Lehmann, K.P., Phillips, S., Sar, M., Foster, P.M. & Gaido, K.W.** (2004). Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci*. 81, 60-68.

**-Lehraiki, A., Racine, C., Krust, A., Habert, R. & Levacher, C.** (2009). Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci*. 111, 372-382.

**-Lee K.Y., Shibutani M., Takagi H., Kato N., Takigami S.** (2004). Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology*. 203, 221–38.

**-Li, H. & Kim, K.H.** (2003). Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on fetal and neonatal rat testis organ cultures. *Biol Reprod*. 69, 1964-1972.

- Li, L.H., Jester, W.F., & Orth, J.M.** (1998). Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, 258-265.
- Lin, L. & Achermann, J.C.** (2008). Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev.* 2, 200-209.
- Litwak G.** (1992). Biochemistry of hormones: steroid hormones. *In: text book of biochemistry with clinical correlation*, (éd) WILEY & SONS.
- Liu K., Lehmann K.P., Sar M., Young S.S. & Gaido, K.W.** (2005). Gene expression profiling following in utero exposure to phthalate esters reveals new gene targets in the etiology of testicular dysgenesis. *Biol Reprod.* 73, 180-192.
- Lock, E.A., Mitchell, A.M., & Elcombe, C.R.** (1989). Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29, 145–163.
- Lovekamp-Swan, T. & Davis, B.J.** (2003). Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ. Health. Perspect.* 111, 139-145.

## M

---

- Mahood, I.K., Hallmark, N., McKinnell, C., Walker, M., Fisher, J.S. & Sharpe, R.M.** (2005). Abnormal Leydig Cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. *Endocrinology.* 146, 613-623.
- Marchlewicz, M., Michalska, T., & Wiszniewska, B.** (2004). Detection of lead-induced oxidative stress in the rat epididymis by chemiluminescence. *Chemosphere.* 57, 1553– 1562.
- Marsman, D.S. NTP.** (1995). Technical report on toxicity studies of dibutyl phthalate (CAS No. 84-74-2) administered in feed to F344 rats and B6C3F1 mice NIH Publication 95-3353. Research Triangle Park: *National Toxicology Program.*
- Martojar, & Martoja, M.** (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. (éd). MASSON, p 346.

- Meeker, J., Sathyanarayana, S. & Swan, S.** (2009). Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos. Trans. Royal. Soc.* 364, 2097–2113.
- Muczynsk, V.** (2011). Polluants environnementaux et développement du testicule foetal humain: effets et mécanismes d'action des phthalates. Université paris-sud 11 faculté de médecine ED. 419 bio signe.
- Murakami, K., Nishiyama, K. & Higuti, T.** (1986) Toxicity of dibutyl phthalate and its metabolites in rats. *Nippon. Eiseigaku. Zasshi. (Jpn J Hyg).* 41, 775-780.
- Murray, R.L.** (1984). Créatinine. In Kaplan A et al. Clin Chem the C.V. mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1261-1266 and 437 and 418.
- Mylchreest, E., Wallace, D.G., Cattley, R.C. & Foster, P.M.** (2000). Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di (n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol Sci.* 55, 143-151.
- Mylchreest, E., Sar, M., Wallace, D.G., & Foster, P.M.D.** (2002). Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol.* 16, 19–28.

## N

---

- Naito, H.K.** (1984). Cholesterol. In Kaplan A et al. Clin Chem the C.V. mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1194-1206 and 437.
- National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS).** (1994). Prestart Study Report: Di-n-butylphthalate (DBP) in rodent plasma. NIEHS, Research Triangle Park, NC.
- National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS).** (1995). Toxicokinetic Study Report: The Toxicokinetics and Metabolism of Di-n-butyl Phthalate. NIEHS, Research Triangle Park, NC.
- Nielson, F.** (1995). Other trace elements. In: Ziegler, E.E., Filer, L.J. Present Knowledge in Nutrition, 7th ed. Press, Washington, DC. 353–377.

-**Nikonorow, M., Mazur, & Piekakaz, H.** (1993). Effect of orally administered plasticizers and polyvinyl chloride stabilizers in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 26, 253-259.

-**NTP.** (1995). Toxicity studies of dibutyl phthalate (CAS no. 84-74-2) administered in feed to F344/N and B6C3F1 mice. National Toxicology Program Toxicity Report Series, 30. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program/National Institutes of Health.

## O

---

-**O'Connor, J.C., Frame, S.R. and Ladics, G.S.** (2002) Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying steroid biosynthesis inhibitors and thyroid modulators. *Toxicol Sci.* 69, 79-91.

-**Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K.** (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.

-**Okada, S., Toyoda, T. & Kozaki, M.** (1978). An easy method for the determination of the optical types of lactic acid produced by lactic acid bacteria. *Agric Biol Chem.* 42, 1781-1783.

-**O.M.S. (Organisation Mondiale de la Santé).** (1993). Analyse du sperme humain et de l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical, éd. INSERM. pp. 55-56.

-**Orgebin-Crist, M.C., Danzo, B.J., Davies, J.** (1975). Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In: Greep R, Hamilton DW, eds. Handbook of physiology-endocrinology V. Baltimore M: Williams and Wilkins. pp. 319-38.

## P

---

-**Page, B.D., & Lacroix, G.M.** (1995). The occurrence of phthalate ester and di-2-ethylhexyl adipate plasticizers in Canadian packaging and food sampled in 1985-1989: a survey. *Food. Addit. Contam.* 12, 129-151.

-**Parks, L.G., Ostby, J.S., Lambright, C.R., Abbott, B.D., Klinefelter, G.R., Barlow, N.J. & Gray, L.E.** (2000). The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol. Sci.* 58, 339-349.

**-Payan, J.P.** (2001). *In vivo* and *in vitro* percutaneous absorption of di n butyl phthalate in rat. *drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 29, 843-54.

**-Petersen, J.H. & Breindahl, T.** (2000). Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Addit Contam.* 17, 133-141.

**-Pirrotta, G.** (1984). Iron binding capacity. In: Kaplan A et al .*Clin chem.* The C.V. Mosby Co. Si louis.Tronto. Princeton. 1063-1065.

## R

---

**-Reddy, J.K., Moody, D.E., Azarnoff, D.L. & Rao, M.S.** (1976). Di-(2 ethylhexyl) phthalate: an industrial plasticizer induces hypolipidemia and enhances hepatic catalase and carnitine acetyltransferase activities in rat and mice. *Life Sci.* 18, 941-945.

**-RTECS.** (1993). Update code 9301 February 1993. Kanagawa-Ken Eisei Kenkyusho Kenkyu Hokoku 3, 1973, 19.

**-Rudel, R., Brody, J., Spengler, J., Vallarino, J., Geno, P., Sun, G., & Yau, A.** (2001). Methods to detect selected potential mammary carcinogens and endocrine disruptors in commercial and residential air and dust samples. *J. Air. Water. Manag. Assoc.* 51, 499–513.

**-Rusyn, I., Peters, J.M. & Cunningham, M.L.** (2006). Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate in the liver. *Crit Rev Toxicol.* 36, 459-479.

**Ryu, J. Y., Lee, B. M., Kacew, S., & Kim, H. S.** (2007). Identification of differentially expressed genes in the testis of Sprague Dawley rats treated with di(nbutyl) phthalate. *Toxicolog.* 234, 103-112.

## S

---

**-Saillenfait, A.M., Sabate, J.P. & Gallissot, F.** (2009). Effects of in utero exposure to di-n-hexyl phthalate on the reproductive development of the male rat. *Reprod. Toxicol.* 28, 468-476.

- Saillenfait, A.M., Roudot, A.C., Gallissot, F., Sabaté, J.P.** (2011). Prenatal developmental toxicity studies on di-n-heptyl and di-n-octyl phthalates in Sprague-Dawley rats. *Reprod. Toxicol.*
- Saint-Laurent, L. & Rhainds, M.** (2004). Phtalates: état des connaissances sur la toxicité et l'exposition de la population général. Institut national de santé publique de québec.
- Sathyanarayana, S., Karr C., Lozano, P., Brown E., Calafat, A., Liu, F. & Swan, S.** (2008). Baby care products: Possible sources of infant phthalate exposure. *Pediatrics*, 121, 260–268.
- Scarano, W.R., Toledo, F.C., Guerra, M.T., Pinheiro, P.F., Domeniconi, R.F., Felisbino, S.L., Campos, S.G., Taboga, S.R. & Kempinas, W.G.** (2010). Functional and morphological reproductive aspects in male rats exposed to di-n-butyl phthalate (DBP) in utero and during lactation. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 73, 972-984.
- Schettler, T.** (2005). Human exposure to phthalates via consumer products. *Int. J. Androl.* 29, 134–139.
- Scott, R.C.** (1987). *In vitro* absorption of some o-phthalate diesters through human and rat skin. *Environmental health perspective.* pp.74, 223-227.
- Scott, H.M., Hutchison, G.R., Mahood, I.K., Hallmark, N., Welsh, M., De Gendt, K., Verhoeven, G., O'Shaughnessy, P. & Sharpe, R.M.** (2007). Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis. *Endocrinology.* 148, 2027-2036.
- Shono, T., Shima, Y., Kondo, T. & Suita, S.** (2005). *In utero* exposure to mono-n-butyl phthalate impairs insulin-like factor 3 gene expression and the transabdominal phase of testicular descent in fetal rats. *J. Pediatr. Surg.* 40, 1861-1864.
- Silva, M.J., Barr, D.B., Reidy, J.A., Kato, K., Malek, N.A., Hodge, C.C., Hurtz, D., 3rd, Calafat, A.M., Needham, L.L. and Brock, J.W.** (2003). Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch. Toxicol.* 77, 561-567.
- Srivastava, S., Singh, G.B., Srivastava, S.P., & Seth, P.K.** (1990). Testicular toxicity of di-n-butyl phthalate in adult rats: effects on marker enzymes of spermatogenesis. *Ind. J. exp. Biol.* 28: 67-70.

---

**-Svechnikova, I., Svechnikov, K. & Soder, O.** (2007). The influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on steroidogenesis by the ovarian granulosa cells of immature female rats. *J. Endocrinol.* 194, 603-609.

**-Swan, S.H., Main, K.M., Liu, F., Stewart, S.L., Kruse, R.L., Calafat, A.M., Mao, C.S., Redmon, J.B., Ternand, C.L., Sullivan, S.** (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ. Health. Perspect.* 113, 1056-1061.

### T

---

**-Tanaka, A., Adachi, T., Takahashi, T. & Yamaha, T.** (1975). Biochemical studies on phthalic esters I. Elimination, distribution and metabolism of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicology.* 4, 253-264.

**-Thompson, C.J., Ross, S.M. & Gaido, K.W.** (2004). Di (n-butyl) phthalate impairs cholesterol Transport and steroidogenesis in the fetal rat testis through a rapid and reversible mechanism. *Endocrinology.* 145, 1227-1237

**-Tomita, I., Nakamura, Y., Yagi, Y & Tutikawa, K.** (1986). Fetotoxic effects of mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) in mice. *Environ. Health Perspect.* 65, 249-254.

**-Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Fail, P.A., Seely, J.C., Brine, D. R., Barter, R.A. & Butala, J.H.** (2004). Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod. Toxicol.* 18, 241-264.

### V

---

**-Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M.** (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1-40.

**-Vernet, P., Aitken, R.J., and Drevet, J.R.** (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 216, 31-39.

**-Voronin, S.M.** (1975). Theorem on the Universality of the Riemann Zeta Function." *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Matem.* 39, 475-486.

### W

---

- Ward, J.M., Peters, J.M., Perella, C.M. & Gonzalez, F.J. (1998). Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice. *Toxicol. Pathol.* 26, 240-246.
- Walseth, F., & Nilsen, O.G. (1986). Phthalate esters: Effects of orally administered dibutylphthalate on cytochrome P-450 mediated metabolism in rat liver and lung. *Acta. Pharmacol. Toxicol.* 59, 263-269.
- Watanabe, N., Shimizu, M., Matsumoto, Y., & Fukuoka, M. (2002). Possible origin of rat testicular atrophy induced by Di-n-butyl phthalate: changes in the activities of some enzymes during rat testis perfusion under hypoxic condition and with Mono-butyl phthalate, *Journal of Health Science.* p. 503-513.
- WHO (world health organisation). (1996). Levels of PCBs, PCDDs, and PCDFs in human milk. WHO European.
- WHO (world health organisation). (1997). Di-n-butyl phthalate, Environmental Health Criteria 189. Genève.
- Williams, D.T., Blanchfield, B.J. (1975). The retention, distribution, excretion, and metabolism of dibutyl phthalate-7-14 C in the rat. *J. Agric. Food Chem.* 23: 854-858.
- Wilson, V.S., Howdeshell, K.L., Lambright, C.S., Furr, J. & Earl Gray, L. (2007). Differential expression of the phthalate syndrome in male Sprague-Dawley and Wistar rats after *in utero* DEHP exposure. *Toxicol. Lett.* 170, 177-184.
- Wine, R., Li, L.H., Barnes, L.H., Gulati, D.K., Chapin, R.E. (1997). Reproductive toxicity of di-n-butyl phthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ. Health Perspect.* 105, 102-107.
- Wittassek M., Angerer J., Kolossa-Gehring M., Schafer S.D., Klockenbusch W., Dobler L. (2009). Fetal exposure to phthalates a pilot study. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 212, 492–498.
- Wormuth, M., Scheringer, M., Vollenweider, M. & Hungerbühler, K. (2006). What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans. *Risk Anal.* 26, 803-824.

X

---

-Xiao-feng, Z., Nai-qiang, Q., Jing, Z., Zi, L. and Yang, Z. (2009). Di (n-butyl) phthalate inhibits testosterone synthesis through a glucocorticoid-mediated pathway in rats. *Int. J. Toxicol.* 28, 448-456.

Z

---

-Zhou, D., Wang, H. & Zhangl, J. (2011). Di-n-butyl phthalate (DBP) exposure induces oxidative stress in epididymis of adult rats. *Toxicology and Industrial Health.* 27(1), 65–71.

-Zhou, D.X., Qiu, S.D., Zhang, J., Tian, H., & Wang, H.X. (2006). The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. *Asian Journal of Andrology.* 8(5), 584–588.





This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.