



République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة باجي مختار عنابة

Université Badji Mokhtar Annaba

Faculté des Sciences  
Département de Biologie

Thèse En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat

Spécialité : BIOLOGIE ANIMALE

Intitulé

Etude de l'impact du Bisphenol A sur L'hépatotoxicité et reprotoxicité et l'évaluation d'un traitement antioxydant l'Apigénine chez un modèle animal Rat *wistar*.

Présentée par : M<sup>me</sup> MESSAOUDI Asma

**Membres de Jury:**

HABACHE Wafa	Pr	Président	Université Badji Mokhtar Annaba
OUALI Kheireddine	Pr	Directeur de thèse	Université Badji Mokhtar Annaba
LAKBAR Chanez	M.C.A	Examineur	Université Badji Mokhtar Annaba
KHALDI Fadila	Pr.	Examineur	Université DE SOUK AHRAS
TADJINE Aicha	Pr.	Examineur	Université D'EL-TARF
GRARA Nedjoud	Pr	Examineur	Université De Guelma

Année universitaire : 2023/2024

## *Remerciement*

Avant tout, je remercie **Allah** le tout puissant qui m'a guidée tout au long de ma vie, qui m'a donnée force, courage et patience incroyables pour passer tous les moments difficiles et a permis à ce travail de voir le jour malgré tous les obstacles que j'ai cru un jour insurmontables... **Alhamdulillah !**

Je suis particulièrement reconnaissante à mon directeur de thèse Monsieur

**K. OUALI**, Professeur, Université Badji Mokhtar Annaba ,qui a dirigé et suivi ce travail dans tous ces détails avec une rigueur scientifique exceptionnelle, ce qui m'a donnée le courage pour poursuivre la réalisation de ce projet de recherche. Je le remercie exceptionnellement pour son appui, sa gentillesse, sa confiance illimitée en moi et son soutien incessant tout au long des années de cette étude. Eternelle reconnaissance et merci encore pour TOUT.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Bio-surveillance Environnementale (LBSE) Université Badji Mokhtar, Annaba ; sous la responsabilité de Monsieur le Professeur **K. OUALI**.

J'exprime ensuite mes remerciements aux membres du jury :

**A Madame W .Habbachi**, Professeur, A à l'université Badji Mokhtar Annaba pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de soutenance.

**A Madame C. LAKBAR**, Maitre de conférence à l'université Badji Mokhtar Annaba, pour avoir pris sur son temps et accepter d'examiner ce travail et participer à ce jury.

**A Madame N. GHERARA**, Professeur, Université 08 Mai 1945, Guelma, Professeur, Université de Guelma, pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail. Je le prie de recevoir toute ma gratitude pour avoir accepté de mettre son expérience à contribution afin de juger ce travail et je lui adresse mes sentiments les plus respectueux.

**A Madame F. KHALDI**, Professeur, à l'université de SOUK AHAS, pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je suis honorée de sa présence. Qu'il soit assuré de ma sincère gratitude.

**A Madame A. TADJINE**, Professeur, Université Chadli Ben Jedid, El Taref, pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de consacrer son temps pour le juger. Je vous prie de croire en mon profond respect.



## **Pour finir ; mes pensées vont à ma famille**

**A mes parents** tout d'abord car c'est avec eux que tout a commencé ! Merci pour votre amour, votre soutien et votre confiance. Merci aussi de m'avoir donné la chance de pouvoir faire ce que je voulais dans la vie. Je suis fière d'avoir des parents comme Vous...

**A mes sœurs**, Merci d'être toujours là pour me soutenir dans les moments difficiles.

**Mes fillettes** : Djanna et Loudjine.

**A mon fils**, lalumière de ma vie, Adem Sacci

**Merci mes amis** pour votre aide, votre soutien et votre amitié.

Durant l'ensemble de mon cursus, je pense que tous les gens qui m'ont entouré méritent mes Remerciements, ne serait-ce que de m'avoir aidé ou tout de moins supporté...



## **Résumé**

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet protecteur et l'action antioxydante d'un flavonoïde « Apigénine » (à raison de 20mg/kg du poids corporel) contre le stress oxydatif induits par le traitement chronique d'un perturbateur endocrinien « le Bisphénol A » à des doses de 1 et 10 mg/ Kg chez le rat Wistar. Les rats ont été répartis en 5 lots de 5 animaux qui ont reçu une administration de BPA et une combinaison de BPA+API par gavage aux doses respectives de 1 et 10mg/kg et 1+20 et 10+20 mg/kg pendant quatre semaines successives. Des mesures des paramètres physiologiques, biochimiques et du stress oxydant ont été effectués au niveau cytosolique.

Nos résultats ont montré que le traitement par le BPA provoque des effets délétères au niveau de l'organisme traduits par une détérioration de l'état de santé général des rats (une réduction de poids corporel et une diminution des poids relatifs des foies et testicules), une altération des hépatocytes par élévation de l'activité des transaminases (ALAT, ASAT) et de la Bilirubine (BT), ainsi une perturbation de l'axe gonadotrope caractérisé par une diminution significative des concentrations des niveaux de la LH et la testostérone plasmatique chez les rats traités par rapport aux témoins. En outre, le BPA a un effet pro-oxydant exprimé par une diminution de la teneur en glutathion réduit (GSH) et de l'activité enzymatique de catalase (CAT), combiné à une augmentation du taux de MDA et de la glutathion S-transférase (GST) dans les organes étudiés (foie, testicules).

Nos résultats montrent également que les suppléments par voie orale, de l'Apigénine, chez les rats traités par le BPA, semblent rétablir certains paramètres biochimiques avec une diminution des effets cytotoxiques du BPA, en augmentant certains antioxydants, et par conséquent atténuer l'intensité du stress oxydant induit par le BPA et confirmé par l'étude histologique du foie et des testicules.

**Mots clés:** Bisphenol A; Hépatotoxicité; Stress oxydant; Antioxydants; Apigénine; rats Wistar.

## **Abstract**

This study has been designed to investigate the ameliorating effect of "Apigenin" (20mg/kg b.wt) against oxidative stress induced by bisphenol A(BPA) in the liver and testis of male rats.

According to the results of this study, the treatment with BPA caused liver and testes dysfunctions, which were revealed by an increase of transaminases (ALAT, ASAT), and bilirubin (BT),hus a disruption of the gonadotropic axis characterized by a significant decrease in the concentrations of the levels of LH and plasma testosterone in the treated rats compared to the controls.

In addition, BPA has a pro-oxidant effect expressed by a decrease in the level of reduced glutathione (GSH) in the tissue.His pro-oxidant action has also been shown by an increase in the level of glutathione S-transferase (GST).

The results suggested that APG supplementation with BPA-treated rats elicited a reduction of the toxic effects of the endocrine disruptors by improving the studied parameters, which was confirmed by the histological study of the testis structure and gonadal axis.

Apigenin appears to have a promising prophylactic effect through its effective anti-radical action against the hepatotoxic and reprotoxic effects of BPA. However, oral supplementation of APG to BPA-treated rats. It improved and restored the previous hepatic parameters. In other words, it attenuated the intensity of the oxidative stress induced by BPA, which was confirmed by the histological amelioration of both liver and testes.

Our results confirm the protective effect of APG against oxidative stress by an improvement in all biochemical and oxidative markers.

**Keywords:** Bisphenol a; Hepatotoxicity; Oxidative stress;Apigenin; Liver; Rats.

الهدف من هذا العمل هو دراسة التأثير المضاد للأكسدة للفلافونويد "أبيجينين" (بمعدل 20 مغ/كغ) وزن حي على الترتيب في حماية الخلايا من الإجهاد التأكسدي والتسمم الخلوي الناتجين عن المعاملة لمسبب اختلال الغدد الصماء "بيسفينول أ" بجرعات (1 و 10 مغ/كغ) وزن حي على الترتيب عند الفئران ذكور من سلالة "Wistar".

اجريت التجارب على فئران ويستار ذكور التي عولجت يوميا لمدة 28 يوما. تم تقسيم الحيوانات الى 5 مجموعات في كل منهما 5 جردان (1) مجموعة شاهدة سلبية لم تتلقى اي علاج . بينما المجموعة (2) و (3) عولجت ب "بيسفينول أ" بجرعات (1 و 10 مغ/كغ) و المجموعة (4) و (5) عولجت بمزيج من "أبيجينين" + "بيسفينول أ" بجرعات 1+20 مغ/كغ و 10+20 مغ/كغ على الترتيب.

تم اجراء قياسات معاملات الاجهاد الفيسيولوجية و البيوكيميائية و الاكسدة على مستوى العصارة الخلوية. اظهرت نتائجنا ان التعرض ل"بيسفينول أ" يسبب تاثيرات ضارة على العضوية يترجم بتدهور الحالة الصحية العامة للفئران عن طريق نقص من وزن الجسم. و نقص الاوزان النسبية لبعض الاعضاء الكبد و الخصيتين. وتلف الخلايا الكبد من خلال رفع نشاط الناقلات الامنية بالاضافة الى اضطراب في محور الغدد التناسلية. انخفاض كبير في تركيز مستويات هرمون تستوستيرون عند الفئران المعالجة. اظهر تحليل معاملات الكبد ان "بيسفينول أ" يؤثر بانخفاض نشاط المؤشرات GSH و CAT و GSTMDA البيولوجية للأكسدة و زيادة انزيمات مضادات الاكسدة في العصارة الخلوية

الكبد و الخصيتين. اظهرت نتائجنا أيضا التأثير الوقائي عند تلقي أبيجينين عن طريق الفم من خلال التحسن في كل المعاملات البيوكيميائية ومؤشرات الاكسدة.

الكلمات المفتاحية بيسفينول أ السمية الكبدية الإجهاد التأكسدي مضاد للأكسدة أبيجينين

# Liste des abréviations

---

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>AFSSA</b>	: Agence Française de Sécurité Sanitaire des aliments
<b>ALAT</b>	: Alanine aminotransférase
<b>ANSES</b>	: Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et de travail
<b>API</b>	: Apigénine
<b>AR</b>	: Androgen Receptor
<b>ARN</b>	: Acide ribonucléique
<b>ASAT</b>	: Aspartate aminotransférase
<b>ATP</b>	: Adenosine triphosphate
<b>BBC</b>	: Bleu brillant de coomassie
<b>BPA</b>	: Bisphénol A
<b>BPA-G</b>	: Bisphénol A-glucuronide
<b>BPF</b>	: Bis(4-hydroxyphényl)-méthane
<b>BPS</b>	: 4,4-dihydroxyphénylsulfone
<b>BSA</b>	: Albumine de sérum de boeuf
<b>°C</b>	: Degré Celsius
<b>CAR</b>	: Constitutive Androstone Receptor
<b>C DNB</b>	: Chlorodinitrobenzene
<b>CL50</b>	: Concentration létale pour 50 % des individus
<b>COX</b>	: Cyclo-oxygénase
<b>CYP</b>	: Cytochrome P450
<b>DES</b>	: Diéthylsibestrol
<b>DJA</b>	: Dose journalière admissible
<b>DL50</b>	: Dose létale pour 50 % des individus
<b>DO</b>	: Densité Optique
<b>DTNB</b>	: Acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque
<b>E2</b>	: L'oestradiol 2
<b>EDTA</b>	: Ethylene Diamine Tetracetic Acid
<b>EFSA</b>	: European Food Safety Authority
<b>ERN</b>	: Espèces réactives à l'azote
<b>ERO</b>	: Espèces réactives de l'oxygène
<b>EPA</b>	: U.S Environmental Protection Agency
<b>Fe</b>	: Fer
<b>g</b>	: Gramme
<b>H</b>	: Hydrogène
<b>H2O2</b>	: Peroxyde d'hydrogène
<b>GOD</b>	: La glucose oxydase
<b>GOT</b>	: Oxaloacétate de glutamate transaminase
<b>GPx</b>	: Glutathion peroxydase
<b>GSH</b>	: Glutathion réduit
<b>GST</b>	: Glutathion S-transférase
<b>LH</b>	: Hormone lutéinisante
<b>MDA</b>	: Malonyldialdéhyde
<b>mmol</b>	: Milimole
<b>NADPH</b>	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>Na2SO4</b>	: Sulfate de sodium anhydre
<b>NH 4+</b>	: Ions d'ammoniac

## *Liste des abréviations*

---

<b>Ni</b>	:Nickel
<b>NO•</b>	: Oxyde nitrique
<b>NO</b>	:Oxyde d'azote
<b>NO<sub>2</sub></b>	:Dioxyde d'azote
<b>NOEL</b>	:Dose sans effet observable
<b>NOS</b>	:Oxyde nitrique synthase
<b>O<sub>2</sub>•</b>	:Anion super oxyde
<b>1O<sub>2</sub></b>	:Oxygène singulet
<b>OH •</b>	:Radical hydroxy
<b>OMS</b>	:l'Organisation Mondiale de la Santé
<b>ONOO-</b>	: Peroxyde nitrite
<b>PC</b>	: Poids Corporel
<b>PE</b>	:Perturbateurs endocriniens
<b>PXR</b>	:Pregnane X Receptor
<b>ROOH</b>	:Hydro peroxydes
<b>SSA</b>	:Sulfosalicylique
<b>pH</b>	: Potentiel hydrogène
<b>μmol</b>	: Micromole
<b>UDP</b>	:Uridine diphosphate
<b>UDPGA</b>	:Acide glucuronique uridine diphosphate
<b>UGT</b>	:Uridine diphosphate glucuronosyl-transférase
<b>Tris</b>	:2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

# *Liste des figures*

## Liste des figures

<b>Numéro</b>	<b>Titre</b>	<b>Pages</b>
<b>01</b>	Les hormones stéroïdes	<b>06</b>
<b>02</b>	Schéma des grandes glandes endocrines du corps humain	<b>11</b>
<b>03</b>	Mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens	<b>13</b>
<b>04</b>	Structure chimique du diethylstilbestrol	<b>14</b>
<b>05</b>	Structure chimique du BPA	<b>16</b>
<b>06</b>	Potentielles sources d'exposition au BPA	<b>20</b>
<b>07</b>	Principales réactions de conjugaison du Bisphénol A	<b>21</b>
<b>08</b>	Réaction de glucuronidation (Glucurono-conjugaison) du BPA par l'enzyme de biotransformation UGT	<b>22</b>
<b>09</b>	Devenir du BPA dans l'organisme après une administration Par Voie Orale	<b>23</b>
<b>10</b>	Structure chimique du bisphénol A et de l'oestradiol	<b>24</b>
<b>11</b>	Réaction de formation du NO à partir de l'arginine	<b>32</b>
<b>12</b>	Mécanisme de production des EROs et ERNs	<b>33</b>
<b>13</b>	Les différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène	<b>35</b>
<b>14</b>	Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires	<b>36</b>
<b>15</b>	Stratégie de lutte des antioxydants contre le stress oxydant	<b>37</b>
<b>16</b>	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques	<b>40</b>
<b>17</b>	Vitamine E	<b>42</b>
<b>18</b>	Vitamine C	<b>42</b>
<b>19</b>	Structure de base des flavonoïdes	<b>45</b>
<b>20</b>	Structure chimique d'un exemple de flavonoïdes comme l'Apigénine	<b>46</b>
<b>21</b>	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	<b>50</b>

## *Liste des figures*

<b>22</b>	Gavage des rats	<b>52</b>
<b>23</b>	Le sacrifice et la dissection des rats	<b>52</b>
<b>24</b>	Principe de dosage du glutathion	<b>56</b>
<b>25</b>	Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique	<b>60</b>
<b>26</b>	Etude de l'évolution du poids corporel chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	<b>68</b>
<b>27</b>	Variation du absolu (g) du foie chez les rats témoins et traités après 28 jours du traitement	<b>68</b>
<b>28</b>	Variation du absolu (g) des testicules et concentration des spermatozoïdes chez les rats témoins et traités après 28 jours du traitement	<b>69</b>
<b>29</b>	Variation de la concentration en Bilirubine en mg/Dl chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement	<b>72</b>
<b>30</b>	Variation de l'activité enzymatique des transaminases ASAT (UI/I) et l'ALAT (UI/I) chez les rats témoins et traités après 28 jours du traitement	<b>72</b>
<b>31</b>	variation du taux de la LH et de la testostérone plasmatique chez les rats témoins et traités pendant 28 jours du traitement	<b>73</b>
<b>32</b>	Variation de la teneur cellulaire en glutathion (GSH), de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST), de la catalase et malondialdéhyde testiculaire chez les rats témoins et traités pendant 28 jours du traitement	<b>74</b>
<b>33</b>	Variation de la teneur cellulaire en glutathion (GSH), de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST), de la catalase et malondialdéhyde testiculaire chez les rats témoins et traités pendant 28 jours du traitement	<b>77</b>
<b>34</b>	Coupes histologiques des testicules chez le rat; témoin (A, B) BPA (C, D) et BPA-API traités (E, F) colorés à l'hématoxyline-éosine	<b>79</b>
<b>35</b>	Photomicrographie de coupes H&E de foie de rats témoins (A et B)	<b>81</b>

---

## Liste des tableaux

<b>Numéro</b>	<b>Titre</b>	<b>Pages</b>
<b>01</b>	Principaux perturbateurs endocriniens hormis les hormones naturelles	<b>09</b>
<b>02</b>	Caractéristiques physico-chimiques du Bisphénol A	<b>17</b>
<b>03</b>	Principales ERO radicalaires et non-radicalaires	<b>29</b>
<b>04</b>	Les deux groupes de polyphénols	<b>43</b>
<b>05</b>	Les caractéristiques physicochimiques de l'API	<b>49</b>
<b>06</b>	Protocole utilisé pour le dosage du GST	<b>59</b>
<b>07</b>	Variation de poids corporel PC (g), poids absolu (g) du foie, de testicule chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement	<b>67</b>
<b>08</b>	Variation de certains biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique chez les rats témoins et traités après 28jours du traitement	<b>71</b>

---

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Remerciements</b>	<b>I</b>
<b>Résumé</b>	<b>II</b>
<b>Abstract</b>	<b>III</b>
<b>ملخص</b>	<b>IV</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>V</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>VII</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>X</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>Partie bibliographique</b>	<b>5 - 46</b>
<b>I. Les perturbateurs endocriniens</b>	<b>5</b>
I. 1. Définition	5
I. 2. Origine des perturbateurs endocriniens	6
I. 2.1. Origine naturelle	6
I. 2.2. Origine anthropique	8
I. 3. Mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens	11
I. 4. Sources et voies d'exposition des perturbateurs endocriniens	13
I. 5. Effets des perturbateurs endocriniens	13
I. 5.1 Diethylstilbestrol : un perturbateur endocrinien modèle	14
I. 5.2. Effet des perturbateurs endocriniens sur la faune	15
I. 5.3. Effet des perturbateurs endocriniens sur l'homme	15
<b>II. Le Bisphénol A</b>	<b>16</b>
II. 1. Structure, propriétés physico-chimiques	16
II. 2. Utilisation du bisphénol A	17
II. 3. Voies d'exposition	18
II. 4. Toxicocinétique	20
II. 5. Effets endocriniens du bisphénol A	24
<b>III. Stress oxydant</b>	<b>29</b>
III. 1. Définition	29
III. 2. Radicaux libres	29
III. 2.1. Type des radicaux libres	30
III. 2.2. Origine des radicaux libres	33
III. 2.2.1. Origine endogène	33

III.2.2.2. Origine exogène	34
III.3. Conséquences du stress oxydant	34
III.3.1. Peroxydation lipidique	35
III.3.2. Oxydation des protéines	35
III.3.3. Oxydation des glucides	36
III.3.4. Dommages de l'ADN	36
III.4. Système de défense antioxydants	37
III.4. 1. Différents types des antioxydants	37
III.4. 1.1. Endogène	37
III.4.1.2. Exogène	41
<b>Partie expérimentale</b>	
<b>I. Matériels et méthodes</b>	<b>48</b>
I.1. Matériel biologique	48
I.2. Matériel chimique	48
I.2.1. Le Bisphénol A	48
I.2.2. Apigénine	48
I.3. Traitement des animaux	49
I.4. Prélèvement des échantillons	51
I.4.1. Prélèvements sanguins	51
I.4.2. Prélèvement des organes	51
I.5. Exploration de la fonction hépatique	52
I.5.1. Dosage de la bilirubine totale	52
I.5.2. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT)	53
I.5.3. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT)	53
I.6. Exploration de la fonction reproductrice	54
I.6.1. Dosage de la testostérone	54
I.6.2. Dosage de la LH	55
I.6.3. Détermination de la concentration de spermatozoïdes dans l'épididyme	<b>55</b>
I.7. Dosage des paramètres du stress oxydant	55
I.7. 1. Préparation de l'homogénat	55
I.7. 2. Dosage des protéines tissulaires	55
I.7. 3. Détermination du taux de glutathion réduit (GSH)	56
I.7. 4. Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST)	58
I.7.5. Détermination du taux de malondialdéhyde (MDA)	60

---

I.7 .6.Dosage de l'activité de la catalase (CAT)	61
I.8. Etude histologique	62
I.9.Etude statistique des résultats	63
<b>II. Résultats</b>	
II.1. Effet du BPA et de la supplémentation de l'API sur les paramètres physiologiques, biochimiques et hormonaux	66
II.1.1. Action sur la croissance corporelle	66
II.1.2.Action sur le poids absolus du foie et testicules	66
II.1.3.Effet du traitement sur certains bios marqueurs plasmatiques de la fonction hépatique	70
II.1.4.Effet du traitement sur les niveaux plasmatiques d'hormones impliqués dans régulation de la fonction reproductrice	73
II.2. Effet du BPA et de la supplémentation en API sur la réponse des bios marqueurs de stress oxydatif	74
II.2. 1. Au niveau hépatique	74
II.2. 1.1. Effet sur le taux du glutathion réduit	74
II.2. 1.2. Activité de la glutathion S-transférase (GST)	74
II.2.1.3. Activité de la catalase (CAT)	74
II.2. 2. Au niveau testiculaire	76
II.2. 2.1. Effet sur le taux du glutathion réduit	76
II.2. 2.2. Activité de la glutathion S-transférase (GST)	76
II.5. Effet du BPA et de la supplémentation en Apigenine sur la structure des testicules	78
<b>III.Discussion</b>	<b>82</b>
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>91</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>93</b>
<b>Annexe</b>	

## Introduction

Au cours de ces dernières années, nous avons observé une augmentation considérable de l'apparition de cancers hormono-dépendants tels que celui du sein, de la prostate, ainsi que l'apparition de pathologies liées au système de reproduction chez l'Homme. Plusieurs études suggèrent que l'apparition et le développement de ces pathologies pourrait être due à la présence de plus en plus importante des polluants environnementaux dans notre vie quotidienne. Elles ont plus particulièrement impliqué des molécules d'origine industrielle ou anthropogénique regroupées sous le terme générique de perturbateurs endocriniens (PE).

Le concept de perturbation endocrinienne par des substances chimiques présentes dans l'environnement est apparu dans les années 1980 à partir de l'observation des anomalies sur les organes reproducteurs chez les animaux de la faune sauvage dans les pays industrialisés (*ex* : masculinisation des femelles des escargots marins après une exposition à un biocide).

Les polluants de la catégorie des perturbateurs endocriniens désignent des composés chimiques exogènes 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. Ils interfèrent avec la synthèse, le stockage, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la fixation et l'action biologique ou l'élimination des hormones naturelles, responsables du maintien de l'homéostasie des processus du développement et/ou du comportement (Kavlock et al., 1996).

En effet, plusieurs produits utilisés en tant que plastifiants dans des objets de consommation courante sont incriminés en tant que perturbateurs endocriniens. Parmi les plastifiants les plus produits dans le monde, le bisphénol A (BPA) fait l'objet de multiples débats, dans les milieux scientifiques, politiques et également dans l'opinion publique.

Le BPA est largement utilisé depuis une cinquantaine d'années, comme monomère dans la production de plastiques de type polycarbonate et de résines époxy, impliqués dans la fabrication de nombreux objets d'utilisation quotidienne par l'homme tels que certains emballages alimentaires comme les boîtes de conserves (Richter et al, 2007). Cette substance chimique est utilisée afin de rendre plus souples les matières plastiques. Les tonnages de production mondiale du BPA sont très élevés. Sa production annuelle était estimée à trois millions de tonnes par an en 2010 (Nam et al., 2010).

Le BPA est lié de façon non covalente dans ces polymères de plastiques, et peut s'extraire naturellement en faible quantité, et à des doses plus importantes lorsque le plastique est exposé à une haute température ou en présence de détergents puissants (Welshons et al, 2006). De plus la libération de molécules semble plus importante lors d'utilisations multiples du contenant. Les utilisateurs de contenants alimentaires à base de BPA sont donc susceptibles d'en ingérer les particules. L'alimentation constitue d'ailleurs la principale source de contamination. Les autres sources de contamination, telles que la manipulation de papiers thermosensibles ou l'inhalation de poussières contaminées par le BPA, sont estimées négligeables à ce jour en population générale (Biedermann et al., 2010).

Il a été démontré que le BPA peut causer des perturbations du système endocrinien, et exercer des effets délétères sur la santé des populations dans plusieurs études animales et des lignées cellulaires humaines (N'tumba-Byn T et al., 2012 ; Kasemi, et al, 2016). Ce perturbateur endocrinien possède une structure proche de celle des oestrogènes naturels, notamment par la présence des groupements phénol (Vogel, 2009). Cette structure imitant la fonction hormonale pourrait affecter le développement, la reproduction et même induire l'apparition du cancer du sein (Durando *et al*, 2006). Toutefois, la toxicité de ce composé est limitée par son élimination rapide par glucuronidation, une voie métabolique conduisant à la production d'un métabolite inactif non toxique (Folia et al., 2017).

Plusieurs études épidémiologiques suggèrent des corrélations entre les taux enregistrés de BPA dans le sang, et les urines, et l'apparition des pathologies à l'âge adulte (obésité, diabète, maladies cardio-vasculaire et l'élévation de marqueurs de toxicité hépatique) (Lang et al 2008; Melzer et al., 2010) alors que 90% de la population américaine était exposée à ce contaminant (Calafat et al., 2008). Il est classé en tant que substance reprotoxique pour la fertilité de l'espèce humaine (Rapport INSERM, 2010). Chez l'homme, les niveaux de BPA ont été associés à une diminution de la fertilité (diminution de la concentration du sperme, du nombre, de la viabilité et de la mobilité des spermatozoïdes) (Takahashi et Oishi., 2001).

Aujourd'hui, le BPA, fait l'objet de nombreuses études expérimentales et épidémiologiques afin de définir de façon précise son degré de toxicité. Des études réalisées chez les rongeurs font état d'effets toxiques du BPA à forte dose sur différents organes comme le foie, la prostate, les seins, et particulièrement sur la fonction de reproduction (Expertise collective de l'INSERM : BPA, Effets sur la reproduction, 2011). Ceci a amené les agences de sécurité sanitaire à définir une dose sans effet toxique observable (NOAEL, no observable adverse effect level) de 5 000 µg/kg/jour et une dose journalière admissible(DJA) de 50 µg/kg/jour (Expertise collective de l'ANSES : Effets sanitaires du BPA). A partir de ces données, des décisions gouvernementales ont été prises quant à l'interdiction de l'utilisation du BPA dans la fabrication de contenants alimentaires. Le Canada fut le premiers pays à voter l'interdiction du BPA dans les biberons, en octobre 2008. La France interdit la commercialisation de biberons contenant du BPA en 2011 puis dans tous les emballages alimentaires à partir du 1er janvier 2015 (Loi n° 2012-1442 du 24 décembre 2012).

De nombreuses études montrent que la toxicité du BPA est principalement due à l'augmentation de génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) conduisant au développement d'un stress oxydatif se traduisant par une peroxydation lipidique et des dommages oxydatifs qui jouent un rôle majeur dans les lésions hépatiques et testiculaires et par la diminution de la capacité antioxydante totale de l'organisme (Kabuto et al. 2004; Qiu et al. 2016).

Devant ces situations, le concept d'une thérapie à l'aide d'antioxydants dans le but de renforcer les défenses antioxydants endogènes pour une protection plus efficace contre le stress oxydatif, représente une perspective et une voie thérapeutique crédible et d'intérêt scientifique et public.

La recherche incessante de nouveaux agents pharmacologiques démontrant une action antioxydante et antiradicalaire a mis la lumière sur les polyphénols qui sont des micronutriments abondants dans les aliments (légumes, fruits) et certaines boissons (vins rouges, jus de fruits), mais ils sont peu abondants dans les huiles (Argan, Olive).

Les polyphénols présentent une activité neuroprotectrice en particulier dans les maladies liées à l'âge associées ou non à des dysfonctionnements mitochondriaux, du stress oxydant et de l'inflammation pouvant aboutir à la mort cellulaire (Upadhyay et al., 2015 ; Carito et al. 2016).

En particulier l'Apigénine appartient à la famille des flavones présent dans les fruits et légumes. Connus par ses propriétés antioxydantes, anti-cancérogènes et anti-inflammatoires (Moosavi et al, 2015 ; Costa et al, 2016). Des études récentes ont démontré que l'apigénine exerce un effet préventif et antioxydant contre un large éventail de xénobiotiques (Wang et al. 2014 ; Ahmad et al, 2019).

L'objectif de cette étude consiste d'une part à évaluer l'impact hépatotoxique et reprotoxique d'un perturbateur endocrinien émergent de la pollution par les plastiques, le bisphénol A chez le rat Wistar via l'analyse de certains bio marqueurs spécifiques à la fonction hépatique et aussi reproductrice. De plus une étude histologique des testicules organe cible de ce perturbateur. D'autre part nous avons évalué l'effet protecteur d'un puissant antioxydant naturel flavonoïde l'Apigénine afin d'apprécier l'impact du stress oxydant induit par ce xénobiotique.

Ce manuscrit comporte trois parties :

- la première consiste en une étude bibliographique dans laquelle seront rapportées certaines informations de base nécessaires pour la compréhension de cette investigation expérimentale.
- la deuxième partie nous exposant le matériel utilisé et la méthodologie adoptée dans l'étude relative à l'effet de BPA sur la fonction hépatique et reproductrice des rats. Cette partie met l'accent sur les détails techniques et l'approche expérimentale qui a été suivie afin d'aboutir aux résultats obtenus.
- La troisième partie est consacrée à l'interprétation et à la discussion des résultats obtenus

### I. Les perturbateurs endocriniens.

Le système endocrinien est composé d'un ensemble de glandes (endocriniens) qui sécrètent des hormones agissant à titre de messagers chimiques et qui sont libérés dans la circulation sanguine pour atteindre des récepteurs nucléaires (protéines ou glycoprotéines) localisés sur des cellules cibles. Ces hormones interviennent sur de nombreuses fonctions métaboliques telles que la reproduction, le développement, la croissance, et le comportement des espèces. Cet équilibre hormonal peut toutefois être perturbé par la présence de substances chimiques étrangères à un organisme vivant. Ces substances chimiques qui perturbent le système endocrinien sont appelées **les perturbateurs endocriniens**.

#### I. 1. Définition

Depuis 1996, plusieurs définitions d'un PE ont été successivement proposées par différents groupes d'organisations gouvernementales et de sociétés savantes.

En 1996, l'Agence américaine de protection de l'environnement (EPA) donne une définition, basée sur le mode d'action des PEs : « *un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des ligands naturels responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme* » (Kavlock et al., 1996). Cette définition ne mentionne pas l'effet délétère sur l'organisme et sur sa descendance, elle fait cependant référence au mécanisme d'action de ces composés.

La définition la plus utilisée aujourd'hui est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2002) : « *Les perturbateurs endocriniens sont des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme qui peuvent interférer avec le fonctionnement des systèmes endocriniens et induire ainsi des effets délétères sur cet organisme ou sur ses descendants.* » (Damstra, 2002). Cette définition limite l'identification d'un perturbateur endocrinien à un effet néfaste avéré qui interfère avec l'action hormonale. Or le lien de cause à effet est difficile à déterminer et exclut de fait de nombreuses substances.

En juillet 2017, la Commission Européenne a ajouté une notion importante, celle de perturbateur endocrinien présumé. La définition de l'OMS de 2002 a donc été complétée : « *un perturbateur endocrinien potentiel est une substance (ou un mélange) exogène, possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, ou chez ses descendants ou au sein de (sous-)population* » (Sénat., 2019).

### I.2. Origine des perturbateurs endocriniens

les PE englobent un grand nombre de molécules chimiques de deux origines distinctes : anthropique ou naturelle et ils sont omniprésents dans les chaînes alimentaires et dans l'environnement (Zoeller et al., 2012).

#### I.2.1. Origine naturelle

Les perturbateurs endocriniens d'origine naturelle comprennent les hormones androgènes, oestrogènes naturelles et les progestagènes naturellement présentes dans l'organisme humain et animal. Ces hormones sexuelles sont des stéroïdes dérivant du cholestérol, qui conduit à la biosynthèse de ces hormones dans les gonades (testicules et ovaires) et les tissus périphériques tels que les glandes surrénales.

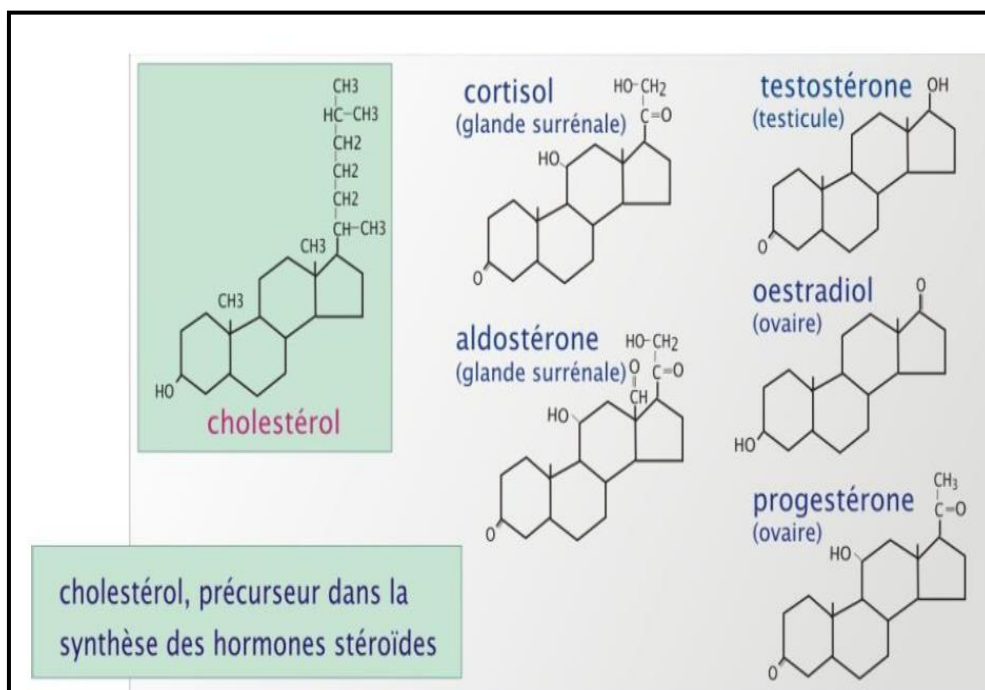


Figure 01 : Les hormones stéroïdes

### **I.2.1.1.Hormones androgènes**

La testostérone représente hormone androgène circulante. Elle est généralement produite par les testicules, cependant de faibles quantités peuvent également être synthétisées par les glandes surrénales et les ovaires. la sécrétion globale de testostérone est de 5 à 7,5 mg/24h chez l'homme adulte normal.

Les effets provoqués par les androgènes sont nombreux. La testostérone provoque le développement des conduits du système reproducteur et la descente des testicules chez les fœtus. Lors de la puberté, ces hormones favorisent la croissance des organes reproducteurs et le développement des caractères sexuels secondaires masculins. Les androgènes jouent également un rôle important dans le comportement sexuel et la spermatogénèse. Elle stimulent, par ailleurs, la synthèse des protéines, qui augmentent la masse musculaire et osseuse (Tostain et al., 2004).

### **I.2.1.2.Hormones œstrogènes naturelles**

Les hormones œstrogènes sont secrétées principalement par les ovaires dans les cellules de la thèque et de la granulosa du follicule ovarien. Chez la femme, trois types d'hormones naturelles sont présentes selon trois stades : l'estrone(E1), 17 B-estradiol (E2), 17  $\alpha$ -estraiol ( $\alpha$ E2) et l'estriol (E3). E2 constitue l'hormone naturelle la plus active sécrétée par la femme.

Elle est synthétisée dans l'ovaire par les cellules de la granulosa des ovaires dès les premiers mois de vie. Il diminue pendant l'enfance, et augmente à partir de la puberté. E2 est sécrété lors du cycle menstruel, avec un pic pré-ovulatoire jusqu'à l'âge physiologique de ménopause. Il permet le maintien de la fertilité et des caractères sexuels secondaire féminins (Christin-Maitre et al., 2016). E2 est équilibré avec E1 et E3; ce dernier s'avère la forme la moins active et peut être considéré comme un produit métabolique des autres oestrogènes. Lors de la fécondation de l'ovules, l' E3 sécrète majoritairement par les trophoblastes du placenta devient, au cours des mois, l' oestrogène le plus important. A la fin de la période de fertilité, E2 remplacé par E1 qui devient alors le principal oestrogène produit par la transformation des androgènes d'origine surrénalienne.

### **I.2.1.3.Hormones Progestagènes**

La progestérone représente la principale hormone progestagène. Elle est sécrétée par les cellules du corps jaune, le placenta et, dans une moindre mesure, par le follicule ovarien. Lors de la phase folliculaire du cycle ovarien, la progestérone commence à être produite un jour ou deux avant l'ovulation par le follicule mur. Après l'expulsion de l'ovule, le follicule se transforme en corps jaune qui sécrète une grande quantité de progestérone pour préparer

l'endomètre à la nidification de l'ovule. Lorsque ce dernier n'est pas fécondé, les sécrétions de progestérone diminuent considérablement en raison de la dégénérescence du corps jaune. En plus d'assurer la régulation des cycles de la reproduction chez la femme, la progesterone maintient la grossesse et prépare les glandes mammaires pour la lactation (De Champlain, 2011).

### **I.2.2. Origine anthropique**

Cette catégorie de substances comprend les hormones de synthèse, des produits chimiques à usage industriel, agricole et également certains produits pharmaceutiques.

#### **I.2.2.1. Hormones de synthèse**

Les hormones de synthèse sont des substances ayant été sélectionnées pour leur bonne affinité avec les récepteurs aux œstrogènes et leur stabilité. Le 17  $\alpha$ -éthynylestradiol (EE2), dérivé d'E2 est le principal œstrogène de synthèse employé dans les contraceptifs oraux (pilules anticonceptionnelles). EE2 administré par voie orale peu métabolisé au niveau hépatique. Il possède une très longue demi-vie plasmatique (15 à 25 jours) contrairement aux œstrogènes naturels qui sont rapidement dégradés par le foie lorsqu'ils sont ingérés. L'EE2 peut également être utilisé pour traiter une déficience ostrogénique (De Champlain, 2011).

Plusieurs produits pharmaceutiques commerciaux disponibles contiennent d'EE2.

#### **I.2.2.2. Dérivés industriels**

Les dérivés industriels des PE sont principalement les alkylphénols et les bisphénols.

##### **I.2.2.2.1. Alkylphénols (APs)**

Les alkylphénols **sont** des substances chimiques non-halogénées. Les principaux utilisateurs de ces produits sont les fabricants de nettoyeurs et de détergents industriels, l'industrie du textile et les fabriques de pâtes et papiers. Ces surfactants sont également utilisés dans de nombreux autres secteurs : traitement du charbon, des métaux, du cuir et des boissons ; transformation des aliments ; préparation de pesticides, de peintures aux latex et d'enduits protecteurs ; désencrage du papier à recycler ; industrie du bâtiment et de la construction.

Cependant, cinq activités industrielles seraient responsables de la plus grande part des rejets d'alkylphénols : la production de pâtes et papiers, le raffinage du pétrole, le nettoyage en milieu industriel, institutionnel et domestique, la production de textiles et la production du cuir (Berryman et al., 2003).

### I.2.2.2. Bisphénols (BPS)

Le bisphenol, le plus connu et le plus utilisé est le **bisphenol A (BPA)** (**molécule retenue pour l'étude**). Le BPA entre dans la fabrication industrielle de matières plastiques de type polycarbonate et de résines époxy. Ils se retrouvent dans le revêtement intérieur de boîtes de conserves, les canettes de boissons et plusieurs emballages alimentaires en plastique, avec parfois un logo de recyclage entourant le chiffre 3,7 ou polycarbonate. Il entre également dans la composition des CD, DVD, de certains produits électroniques et de l'industrie automobile, des téléphones portables, des lunettes et lentilles de contact, ainsi que les tickets de caisse à encre thermique. Les résines époxy contenant du BPA sont également utilisées dans des systèmes de stockage et de transport de l'eau et dans certains pansements dentaires (Vandenberg et al., 2012). Les dérivés halogénés du BPA peuvent également contaminer l'air intérieur des logements en cas d'utilisation (Braun et al., 2011).

Outre le BPA, de nombreux analogues de bisphénol peuvent être obtenus par condensation d'une cétone ou d'un aldéhyde avec des phénols soit avec une variation dans le dérivé carbonyle, soit dans les substituants sur le cycle aromatique. Cependant, beaucoup sont trop coûteux pour une application industrielle. La toxicité de la plupart de ces composés n'est pas connue avec précision.

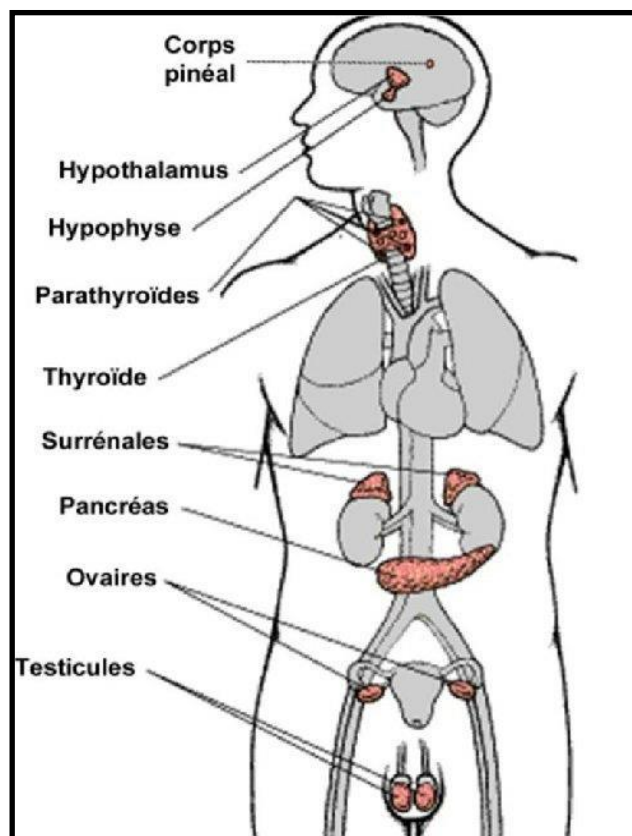
Le bisphénol-f ou BPF (bis (4-hydroxyphényl)-méthane) est de plus en plus utilisé, en raison de sa faible viscosité et sa meilleure résistance aux solvants par rapport à la résine époxy. Le bisphénol S ou BPS (4,4-dihydroxyphénylsulfone) est également utilisé comme monomère dans l'industrie du plastique (Danzel et al., 2009)

**Tableau 01 : Principaux perturbateurs endocriniens hormis les hormones naturelles**  
 (Colborn et Clement, 1992 ; Colborn et al., 1993 ; Brevini et al., 2005).

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

### I.3.Mécanisme d'action :

Les perturbateurs endocriniens exercent une action sur les principales fonctions de l'organisme notamment sur le métabolisme, la fonction reproductrice, la croissance, le développement ainsi que l'homéostasie. Le système endocrinien est présenté à la figure 2.



**Figure 02. Schéma des grandes glandes endocrines du corps humain**

(Gore *et al.*, 2009).

Les perturbateurs endocriniens peuvent agir sur différentes catégories de récepteurs, qui peuvent être classés en deux grands types :

- les récepteurs des xénobiotiques (par exemple, le récepteur intranucléaire au pregnane PXR pouvant se lier aux médicaments et aux pesticides) qui ont pour fonction principale l'adaptation de l'organisme à l'afflux de ces derniers. Ceux-ci sont responsables de l'induction de systèmes enzymatiques et de leur élimination.

- les récepteurs de ligands endogènes comme les récepteurs hormonaux, pouvant être modulés par ces xénobiotiques (par exemple les récepteurs aux oestrogènes ER  $\alpha$  et  $\beta$ , les récepteurs AR, TR et GR), leur activation illégitime conduisant ainsi à une perturbation endocrinienne ou métabolique.

Les PEs peuvent être classées selon leur origine et il peuvent être également répertoriés selon leur mécanisme d'action. Les perturbations de système endocrinien par ces substances chimiques résultent de diverses actions (Pinson et al., 2017):

✚ **imitation de l'action des hormones endogènes** (effet agoniste): la substance PE de structure similaire à celle de l'hormone peut interagir directement avec le récepteur cellulaire et l'activer, mimant l'action d'une hormone endogène et induisant des effets similaires, notamment par l'activation ou l'inhibition de transcription des gènes (exemple de PE à activité oestrogénique: nonylphénol, éthinyléstradiol) (Balaguer and Bourguet, 2017)

✚ **inhibition des interactions entre les hormones et leurs récepteurs** (effet antagoniste) :

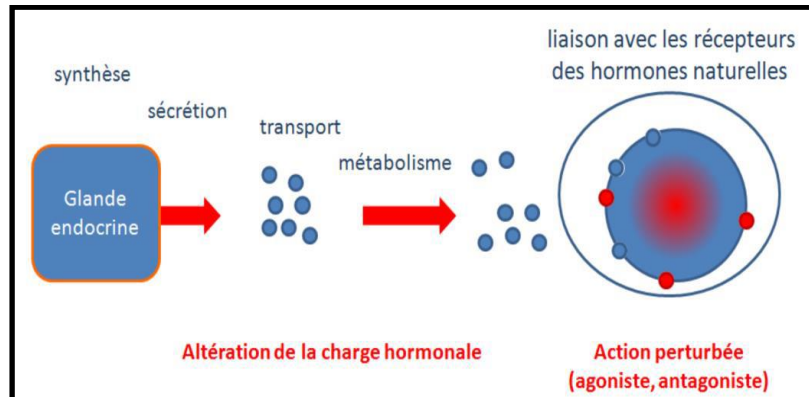
La substance PE se fixe sur le récepteur sans l'activer, en empêchant la liaison de l'hormone endogène à son récepteur. Il bloque le fonctionnement de récepteur qui affecte les fonctions cellulaires normales liées à l'hormone, en empêchant la fixation du complexe hormone/récepteur sur l'ADN, et donc l'activation des gènes cibles (exemple de PE à activité anti-androgénique: bisphénol A) (Beltrand et al., 2017)

✚ **action sur la synthèse, le transport, le métabolisme et l'excrétion des hormones :**

La substance PE peut modifier le métabolisme intracellulaire des glandes sécrétrices, en perturbant la biosynthèse des hormones elles-mêmes par modification des concentrations d'hormones endogènes. En particulier, certains PE sont capables d'affecter les enzymes de synthèse de la stéroïdogenèse, intervenant ainsi dans la synthèse des androgènes. (Balaguer and Bourguet, 2017)

✚ **altération de développement des récepteurs hormonaux et leurs fonctions:** la substance PE peut altérer les activités hormonales en activant ou supprimant le développement d'un récepteur cellulaire. Le bisphénol A est par exemple capable d'altérer la régulation protéique du récepteur nucléaire et/ou de ses cofacteurs par la voie de dégradation du protéasome.

✚ **altération des fonctions par des interactions avec les hormones:** la substance PE peut interagir avec une hormone et modifier son message, et ainsi altérer les fonctions cellulaires.



**Figure 03. Mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens**

(Chevrier *et al.*, 2011).

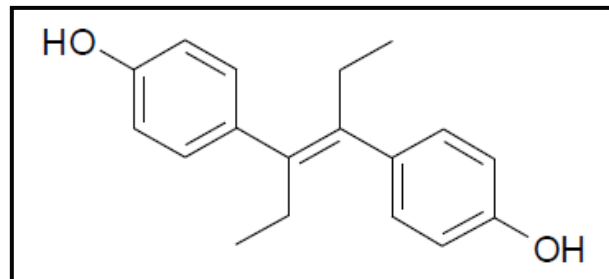
**I.4. Sources et voies d'exposition :** Les sources d'exposition aux PE sont nombreuses : air, eau, sols, alimentation, poussières, produits du quotidien (produits de soins personnels, produits ménagers, jouets, produits électriques, matériaux de construction, papiers, vêtements, produits de jardinage).

L'exposition se produit par la voie cutanée, par inhalation et par ingestion. La part de l'exposition imputable à chaque source est variable selon le PE considéré, et la voie d'absorption principale dépend de ses caractéristiques physico-chimiques (Diamanti-Kandarakis E *et al.*, 2009).

### **I.5. Effets des perturbateurs endocriniens**

Les effets des perturbateurs endocriniens sur la santé humaine et notamment sur la fertilité masculine sont actuellement une préoccupation de santé publique. L'impact négatif des hormones, en particulier des oestrogènes, sur la reproduction masculine est très bien illustré par les effets d'une exposition *in utero* au diéthylstilbestrol (DES).

### I.5.1 Diethylstilbestrol : un perturbateur endocrinien modèle



**Figure 04: Structure chimique du diethylstilbestrol**

Le DES (Distilbène®) est un oestrogène synthétique commercialisé depuis 1940 pendant une trentaine d'année comme un traitement aux femmes pendant la grossesse pour prévenir les risques d'avortement, les risques de prématurité, et traiter les hémorragies gravidiques (Figure 19).

De nombreuses anomalies génitales sont apparues dans les décennies suivant les premières prescriptions parmi les enfants nés de mère ayant pris du DES pendant la grossesse :

➤ chez les filles : malformations des organes reproducteurs à la naissance (utérus « en T »), formes rares de cancer du vagin et de la vulve (adénocarcinome à cellules claires), cancer du sein, nombreux cas de stérilité et ménopause précoce. chez les garçons : sténoses et malformations de l'urètre (hypospade), testicules non descendus (cryptorchidie), atrophie testiculaire, kystes de l'épididyme .

Le DES n'est plus utilisé chez la femme enceinte à partir de 1971 aux États-Unis. En France ce n'est qu'en 1977, après la naissance de 160 000 enfants dont la mère avait pris ce médicament, qu'une décision analogue a été prise (Jeanblanc .,2014).

Mais les études récentes montrent que les effets d'une exposition au DES peuvent s'étendre sur plusieurs générations. L'étude menée par l'équipe du professeur Sultan (CHU Montpellier) montre qu'en France les enfants nés des mères exposées *in utero* au DES présentent 3,5% de malformations au niveau de l'appareil génital mâle (Hypospadias) et 28,4% de malformations au niveau de l'appareil génital femelle (anomalies de Müller), ces mêmes femmes donnent naissance à des petits fils avec 8,2% d'Hypospadias (Kalfa et al

2011). Une autre étude montre l'existence d'une corrélation entre une exposition au DES et l'apparition des anomalies à la naissance (génito-urinaires, squelettiques, musculaires et neurologiques) chez les petits-fils (**3ème génération**) (Titus-Ernstoff et al 2010).

### **I.5.2.Effet des perturbateurs endocriniens sur la faune**

Au début des années 90, Matthiessen et Sumpter (1998) ont signalé une intersexualité chez les poissons exposés aux effluents usés de l'industrie du papier et de l'industrie chimique. Aucune substance précise n'a été identifiée comme étant responsable de cette perturbation mais les hormones naturelles d'origine humaine et de synthèse comme l'estradiol, l'estrone et l'éthinylestradiol et les alkylphénols ont été fortement suspectés (Desbrow et al., 1998).

Les effets constatés sur la faune sont des malformations des organes génitaux, des anomalies du comportement sexuel, ainsi qu'une baisse de la fertilité pouvant conduire à la disparition de populations entières. Ces effets ont été confirmés expérimentalement par de nombreuses études. Par exemple, chez les souris et les rats exposés en période prénatale et néo-natale au BPA, il a été constaté des malformations du pénis et de l'urètre, une augmentation de la taille de la prostate, une diminution de la production du sperme, une puberté précoce chez la femelle, une hyperactivité avec agressivité, des anomalies des noyaux gris centraux et une diminution de la dopamine (Richter et al., 2007; Vom Saal et al., 1998).

### **I.5.3.Effet des perturbateurs endocriniens sur l'homme**

Les effets de l'exposition à faibles doses des PEs sur la santé humaine sont sujets à controverse. Un certain nombre d'affection sont aujourd'hui suspectées d'être la conséquence de l'exposition à ces substances : altération des fonctions de reproduction et cancers hormono-dépendants notamment. De nombreuses études épidémiologiques ont montré une augmentation des malformations génitale chez les garçons (cryptorchidie, hypospadias), des cancers testiculaires et une diminution de la fertilité masculine (Carlsen et al.,1992).

En 2010, d'après Duval et Simonot(2010), le Dr Béatrice Vuaille rapportait les resultats d'une étude épidémiologique américaine parue dans Environmental Health Perspectives (Wolff et al., 2006). Les résultats sur l'étude réalisée chez 1559 fillettes aboutie à des taux significativement élevés de phénols, phtalates et phyto-œstrogènes de nature à perturber le développement pubertaire et d'autre part à entrainer un risque de complication plus tard dans la vie notamment de cancer du sein. L'étude signale un engagement dans la puberté plus

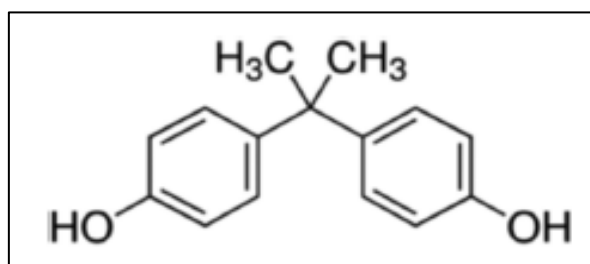
précoce, un engagement pubertaire pour un stade mammaire B2 qui correspond à la surévaluation de l'auréole mammaire. Pour ces fillettes, 25% étaient engagées dans une puberté à 8ans, 50% à 9 ans.

Progressivement la recherche a commencé à ouvrir de nouvelles perspectives concernant le développement neuro-cognitif; de nombreux travaux récents indiquent que l'exposition à certains PE pendant la période périnatale a des conséquences sur le développement neurologique et cognitif. Cela peut bien entendu être lié aux récepteurs stéroïdiens, mais d'autres cibles sont à envisager comme la fonction thyroïdienne ou l'homéostasie des neurotransmetteurs, voire d'autres mécanismes développementaux (Barouki, 2016). un autre système s'est aussi révélé être une cible privilégiée des PE c'est le système immunitaires, avec divers impact sur l'immunosuppression, les maladies auto-immunes, les allergies et l'inflammation (Vandenberg et al., 2012; Zoller et al., 2012).

## II. Le Bisphénol A (BPA)

### II.1. Structure, propriétés physico-chimiques

Le Bisphénol A [(2,2-(4,4'-Dihydroxydiphenyl) propane] (BPA) est synthétisé pour la première fois en 1891 par le chimiste russe Alexandre Dianin. C'est un composé chimique issu de la réaction entre deux équivalents de phénol et un équivalent d'acétone (figure1); la réaction est catalysée par l'acide chlorhydrique ou une résine de polystyrène (Vogel 2009). Le BPA est utilisé principalement comme monomère dans la polymérisation de deux matières plastiques : le polycarbonate et les résines époxy (Vandenberg et al., 2007 ; Flint et al., 2012).



**Figure 05: Structure chimique du bisphénol A 2,2-(4,4',dihydroxyphényl) propane**

Le BPA est un solide blanc de faible émanation phénolique qui a été synthétisé chimiquement sous forme de poudre, écailles ou cristaux. Il est peu à moyennement soluble dans l'eau, soluble dans l'acide acétique, les solutions aqueuses alcalines et dans quelques solvants (tels

que l'éthanol, l'acétone et le méthanol), mais il est insoluble dans le n-heptane ou le dichlorométhane (Rubin, 2011; Hoekstra et al., 2013).

Sa structure s'apparente à celle des œstrogènes naturels, notamment par la présence de groupements phénols, ce qui lui confère une activité œstrogénomimétique de par sa capacité à se lier aux récepteurs des œstrogènes (Rubin, 2011).

**Tableau 02 : Caractéristiques physico-chimiques du Bisphénol A (INRS, 2010; Saal et al.,2012)**

Propriétés chimique	Bisphénol A
Formule chimique brute	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
Poids moléculaire (g/mol)	228,3
N°CAS (Chemical Abstract Service)	80-05-7
Point de fusion (°C)	150-157°C
Solubilité dans l'eau (mg/l)	120-300 à 25°C à pH=7
Log K <sub>ow</sub>	3.32-3.4
Pression de vapeur (Pa)	5,3. 10 <sup>-6</sup> Pa à 25°C
Densité liquide	1.1 à 1.2
Constante d'ionisation (pKa)	9.73 (9.6-10.2)
Coefficient de partage (sang/plasma)	0.67-1.1

### II.2. Utilisation du bisphenol A

Depuis le début des années 60, le BPA est grandement utilisé dans l'industrie du plastique. Ses propriétés une fois polymérisé (haute résistance à la chaleur, caractéristiques optiques, facilité d'utilisation) en ont fait une molécule de choix dans l'industrie des plastiques.

En 2006, sa production à l'échelle planétaire a été estimée à environ 3,8 millions de tonnes par an, utilisées aux deux tiers pour la fabrication du polycarbonate, et pour un tiers pour celle de résines (DHI, 2007).

Le BPA entre dans la fabrication industrielle de plastiques de type polycarbonate et de résines époxy-phénoliques. De ce fait, on le retrouve dans le revêtement intérieur de boîtes de conserves, les canettes de boissons et plusieurs emballages alimentaires en plastique, avec la signalisation d'un logo de recyclage entourant le chiffre 3, 7 ou PC "polycarbonate". De plus,

il rentre dans la composition des CD, DVD, de certains produits électroniques et de l'industrie automobile, des téléphones portables, des lunettes et des lentilles de contact, ainsi que les tickets de caisse à encre thermique ou encore les reçus des distributeurs automatiques de billets, et quelques équipements médicaux (Maia et al., 2009; Nam et al., 2010).

les résines époxy contenant du BPA sont également utilisées dans des systèmes de stockage et de transport de l'eau "réseau de distribution et réservoir d'eau" et dans certains ciments dentaires (Rudel et al., 2011).

### **II.3. Voies d'exposition (les voies d'exposition pour l'homme)**

L'exposition de la population humaine au BPA se fait majoritairement par la voie orale, principalement par le biais de l'alimentation, et minoritairement par voie respiratoire, soit l'inhalation de poussières, ou par contact cutané avec des matériaux à base de BPA.

#### **✚ Exposition alimentaire**

Le BPA peut migrer dans les denrées alimentaires et les boissons conditionnées dans des emballages fabriqués à partir de BPA polymérisé, contaminant ainsi le consommateur (Cao et al.:2009). Les taux de migration dépendent directement des conditions de stockage et d'utilisation, du temps et de la température de chauffage, de la durée de conservation et du pH des aliments (Welshons, Nagel et al. 2006). Par exemple, un chauffage à des températures élevées lors de la stérilisation ou de l'appertisation (procédé d'autoclavage après la mise en conserve) accroît considérablement la migration du monomère vers l'aliment. Cette migration est également importante dans le cas de produits alimentaires acides, aboutissant à augmenter les concentrations de BPA libre dans le produit consommé (Kang, Kondo et al. 2006; Vandenberg, Hauser et al. 2007).

#### **✚ Exposition par inhalation**

Divers enquêtes de recherches ont indiqué qu'il pouvait y avoir un risque d'exposition humaine au BPA par l'inhalation de poussières intérieures ou extérieures du fait de sa large production, utilisation et distribution (Volkel et al., 2008 ; Loganathan et Kannan, 2011). L'usage du bisphénol A dans les processus de fabrications de certains revêtements de sol, certaines peintures, matériel électrique ou électronique conduit à la contamination de l'air ambiant par des particules de BPA et constitue une autre source d'exposition de la population humaine. Plusieurs études rapportent des concentrations moyennes de BPA dans les échantillons de poussières intérieurs ménagères qui varient entre 60 et 843 ng/g; la quantité inhalée reste faible par rapport à la dose journalière admissible (DJA). Ces résultats sont en accord avec une étude réalisée sur une population d'enfants en bas âge aux États-Unis, qui

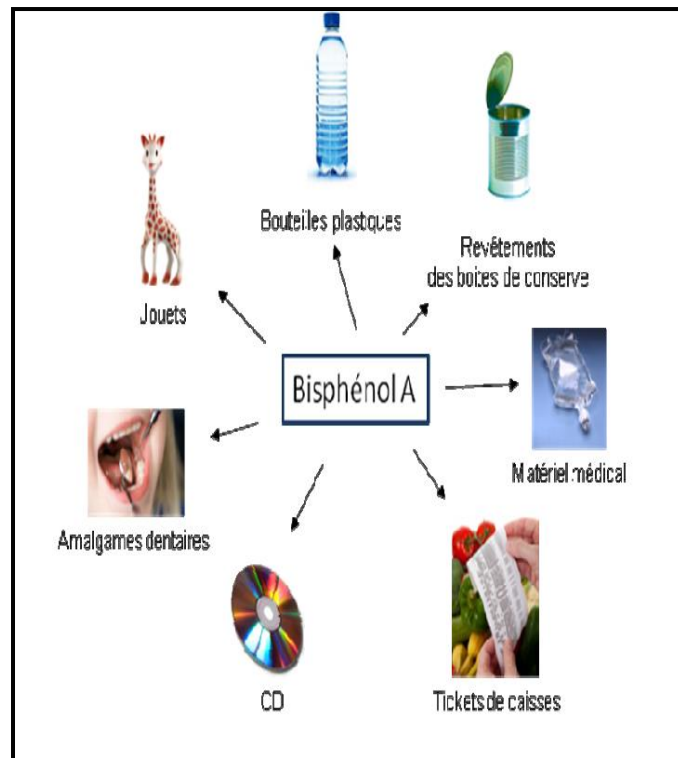
indique que le BPA contenu dans l'air inhalé ne contribuerait qu'à 1 % de l'exposition totale au BPA (Wilson et al., 2007).

### Exposition cutané

De récents travaux de recherche ont également mis en évidence une exposition cutanée au BPA mais qui reste faible comme source de contamination (Biedermann et al., 2010 ; Zalko et al., 2011). Cette voie d'exposition pourrait concerner des milieux professionnels, en particulier chez les ouvriers de l'industrie du plastique et aussi chez les caissières. La quantité moyenne du BPA présente dans les billets de caisse est estimée à environ 13.3 g/kg de papier (Liao, Kannan., 2011). Dans le domaine des papeteries, le BPA est utilisé pour produire les papiers d'impression thermique ; en réagissant à la température, il libère un colorant (lactone) qui révèle l'encre noire sur les billets de caisse, relevés bancaires etc. L'utilisation répétitive de 10 heures par jour approximativement et la manipulation fréquente de ces billets de caisse causerait une absorption quotidienne de 71 µg du BPA par le seul passage transcutané, ce dernier étant facilité par des mains humides et type de peau grasse. Néanmoins, la possibilité d'une exposition par un transfert percutané ne dépasserait pas les 3 % de la DJA (Biedermann et al., 2010), participant très minoritairement à l'exposition totale au BPA de la population générale (Marquet et al., 2011; Kaddar et al., 2008 ).

### Exposition par les composites dentaires

Une exposition orale au BPA a été observée lors de soins dentaires par l'utilisation de résines, de ciments et de scellements dentaires contenant en partie ce composé. Le BPA peut migrer dans la salive provoquant une augmentation significative mais temporaire de la concentration salivaire de bisphénol A chez l'enfant et l'adulte. Par exemple, il est détectable dans la salive jusqu'à 3 heures après la pose de résine (Zimmerman-Downs, Shuman et al. 2012). Toutefois, l'exposition au BPA dans le cadre d'un traitement dentaire reste marginale par rapport aux autres sources d'exposition orale.



**Figure 06 : Potentielles sources d'exposition au BPA**

### **II.4. Toxicocinétique**

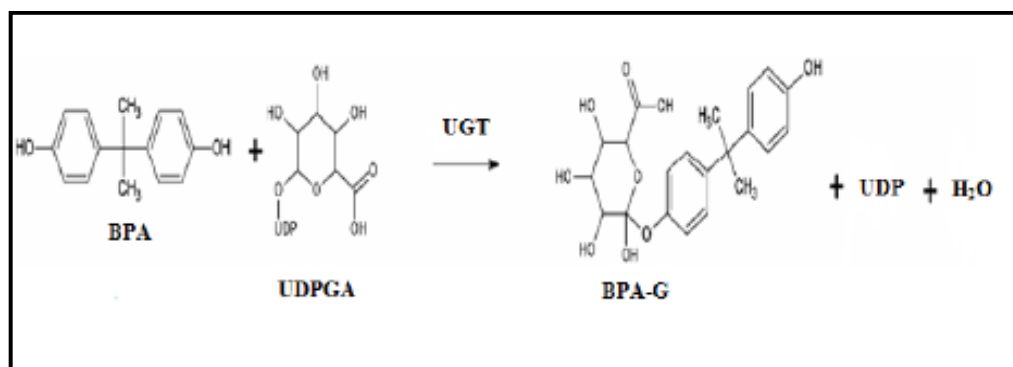
Afin d'évaluer la toxicité du BPA, il est indispensable de connaître les capacités de biotransformation de ce contaminant par les organismes. Le métabolisme du BPA met en jeu des réactions enzymatiques de conjugaison dites de (phase II) qui consistent à ajouter un groupement généralement hydrosoluble, dont l'acide glucuronique et les sulfates, au composé parent (lipophile). Ces réactions ont principalement lieu dans le foie mais peuvent aussi se produire ailleurs, notamment au niveau intestinal, soit au niveau des entérocytes (Hanioka et al., 2008).

La principale réaction décrite dans la littérature est la glucuronidation qui correspond à la formation d'un composé glucuronoconjugué, le BPA-glucuronide (BPA-G) à partir d'un cofacteur, l'acide uridine diphosphate-glucuronique (UDPGA). Cette réaction est catalysée par l'UDP-glucuronosyltransférase (UGT) (Volkel W et al., 2002 ; Yokota, Inoue et al., 1999).

## Partie bibliographique

Les UGTs sont des enzymes présentes majoritairement dans le foie mais qui sont également retrouvées dans de nombreux autres tissus dont l'intestin (Radomska-Pandya et al., 1998). Une variété d'isoenzymes de l'UGT sont impliquées dans la glucuronidation du BPA selon les espèces, comme l'UGT2B1 qui a été identifiée dans le foie, les reins et les testicules chez le rat (Yokota et al., 1999) et son orthologue l'UGT2B7 ou UGT2B15 chez l'homme (Hanioka et al., 2008; Mazur et al., 2010). Ces enzymes de la famille des UGT2B sont aussi impliquées dans la glucuronidation des hormones stéroïdiennes, dont la 17 $\beta$ -estradiol (E2).

Le métabolite conjugué BPA-G ne possède pas d'activité oestrogénique, car il n'est pas un ligand des récepteurs aux œstrogènes (Matthews et al., 2001). Le métabolisme de biotransformation du BPA en BPA-G représente donc un mécanisme de détoxification de l'organisme, un moyen de limiter l'exposition interne de la molécule libre et un rôle protecteur de l'organisme contre les perturbations du système endocrinien.



**Figure 07 : Principales réactions de conjugaison du Bisphénol A. (Sulfatase, UDP-Glucuronosyl- transférase). Les deux principaux métabolites (BPA-Glucuronide), (BPA-Sulfate). BPA: bisphénol A; UDPGA: l'acide uridine diphosphate-glucuronique; UGT: Uridine diphosphate Glucuronosyl-Transférase; BPA-G: bisphénol A glucuronide; UDP: Uridine diphosphate; H<sub>2</sub>O: eau.**

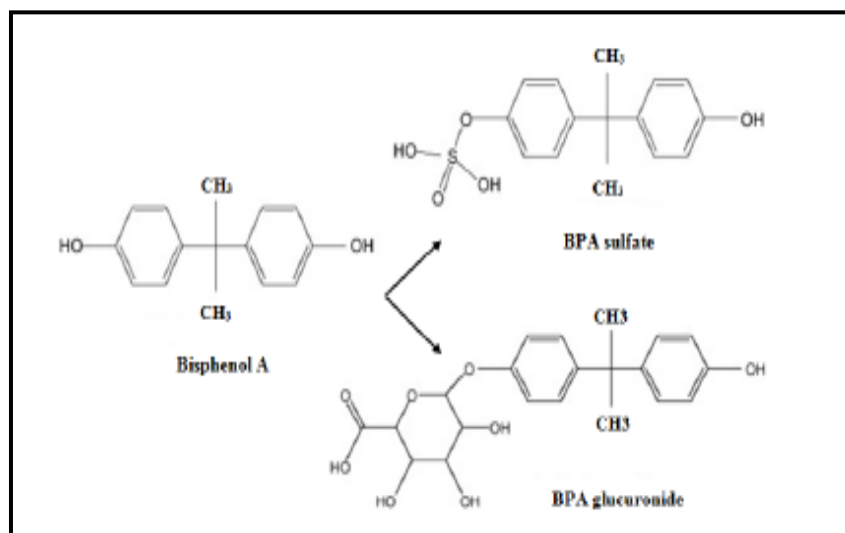
La sulfatation (Figure 3) est une voie secondaire dans le métabolisme du BPA, tant chez les rongeurs que chez l'homme, avec la génération du métabolite BPA-sulfate qui ne possède pas d'activité oestrogénique (Shimizu et al., 2002). Les données in vitro de Kurebayashi et al. (2010) suggèrent que le BPA-sulfate (BPA-S) représente un métabolite mineur en moyenne de 20 % chez le rat et de 9 % chez l'homme. Une autre étude in vivo de l'équipe de recherche de Pottenger et al. (2000) a montré que le BPA-S était détecté dans l'urine après l'administration d'une molécule organique radioactifcarbone quatorze ([<sup>14</sup>C]-BPA). Ce

## Partie bibliographique

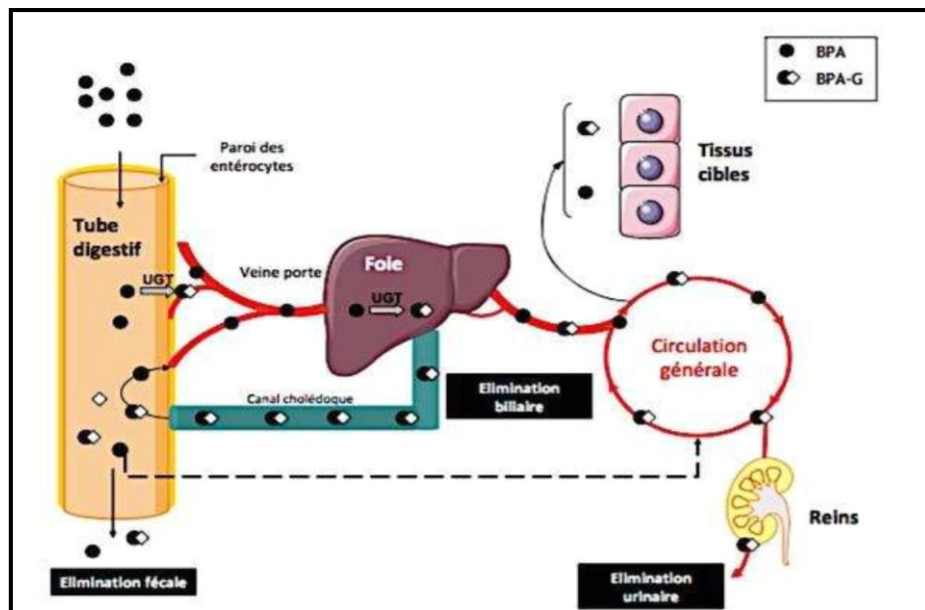
métabolite sulfaté représentait entre 3 et 7 % de la dose administrée dépendamment de la dose et de la voie d'administration chez le rat (Pottenger et al.,2000).

Toutefois, cette voie métabolique reste peu étudiée. En outre, la biotransformation du BPA peut être plus complexe avec la formation de diconjugués méthylés et/ou déshydratés ainsi que des métabolites hydroxylés dont des catéchols 3 et 7 % de la

dose administrée dépendamment de la dose et de la voie d'administration chez le rat (Pottenger et al.,2000). Toutefois, cette voie métabolique reste peu étudiée. En outre, la biotransformation du BPA peut être plus complexe avec la formation de diconjugués méthylés et/ou déshydratés ainsi que des métabolites hydroxylés dont des catéchols (Zalko et al., 2003). (Zalko et al., 2003).



**Figure 08 :Réaction de glucuronidation (Glucurono-conjugaison) du bisphénol A par l'enzyme de biotransformation UGT (uridine diphosphate glucuronosyl transférase).**



**Figure 09: Devenir du BPA dans l'organisme après une administration Par Voie orale (● BPA : bisphénol A ; ◆ BPA-G : bisphénol A-glucuronide))**

L'étude d'Inoue et al. (2002) indique que le BPA se caractérise par une métabolisation plus lente chez les rongeurs et plus rapide chez l'humain, avec une demi vie longue moyenne de 39.5 heures lorsqu'il est administré par voie intraveineuse (IV) chez le rat. En revanche, chez l'homme, le temps de demi-vie plasmatique moyen du BPA total est plus petit (environ 4-6 heures). Cette différence peut être expliquée en raison d'absence du cycle entéro-hépatique chez ce dernier, contribuant ainsi à une excrétion plus rapide (Volkel et al., 2002; Volkel et al., 2005).

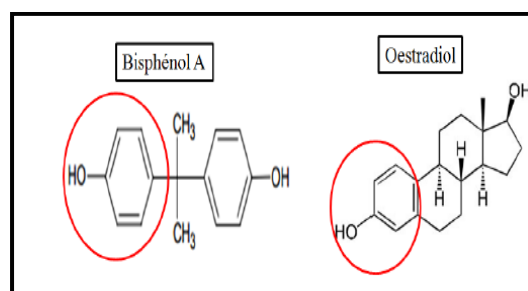
Chez l'homme, le BPA est rapidement absorbé par le tractus gastro-intestinal (GI) et conjugué dans le foie en conjugués hydrosolubles qui pourront après être facilement éliminés de l'organisme par voie urinaire ou fécale. Le BPA conjugué est rapidement filtré depuis le sang par les reins (filtration glomérulaire), et excrété dans l'urine sous forme de BPA-G. Par contre, chez le rat, le processus d'élimination est distinct, où une grande partie du BPA conjugué est amené dans la bile et par la suite conduit, excrété par voie fécale (Volkel et al., 2002). Le poids moléculaire seuil pour l'élimination biliaire est de l'ordre 200-300 g/mol chez le rat, alors qu'il est de 500-600 g/mol chez l'homme. Le BPA-G ayant un poids moléculaire

de 404g/mol serait principalement éliminé dans les urines chez l'humain, alors qu'il serait éliminé en partie via la bile chez le rat (Clark et al.,1969).

### II.5.Effets endocriniens du bisphénol A

Le BPA est qualifié de perturbateur endocrinien car de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'il possède des propriétés oestrogène-mimétiques suspecté par conséquent, il peut causer des effets indésirables sur la santé des humains en raison de ses propriétés néfastes sur la reproduction, le développement et le métabolisme, Chez l'animal, suspectés chez l'homme, même à des faibles niveaux d'exposition (Vom Saal et al.,2007).il est capable de se lier aux récepteurs nucléaires des œstrogènes mais avec une faible affinité, 10 000 fois inférieure à celle de l'œstradiol.

le BPA présente une structure proche de celle de l'œstradiol, qui lui confère ses propriétés oestrogène-mimétique et sa capacité à se lier aux récepteurs aux oestrogènes RE  $\alpha$  et RE  $\beta$ , activant une cascade de réactions à l'origine d'une perturbation de l'équilibre hormonal de l'organisme et par conséquent d'avoir des impacts délétères sur un large spectre de fonctions de l'organisme ou également sur sa descendance (Kamrin,2004). Ces effets pourraient être en lien avec des fenêtres d'expositions pendant les phases sensibles du développement de l'individu (phases périnatales) (Kamrin, 2004).



**Figure 10: Structure chimique du bisphénol A et de l'œstradiol.**

Plusieurs études animales *in vivo* du BPA ont démontré des anomalies et des toxicités à des doses à l'ordre de microgrammes ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou du nanogrammes ( $\text{ng}/\text{kg}$ ), sur la fonction de reproduction provoquant une réponse dans l'expression des gènes en se liant aux récepteurs nucléaires des œstrogènes (Richter et al., 2007). Les effets observés sont la hepto-toxicité,

l'altération de la fonction thyroïdienne, l'induction de cancer, une perturbation du métabolisme des lipides et des sucres, une interaction avec le système immunitaire du tractus digestif et des modifications comportementales (Richter et al., 2007).

### II.5.1. Repro-toxicité

De nombreuses études réalisées sur des modèles animaux ont montré qu'une exposition *in utero* au BPA s'accompagne, dès la naissance et jusqu'à l'âge adulte, de troubles de la fonction de reproduction et de développement au niveau des organes génitaux chez la progéniture mâle et/ou femelle (Vandenberg et al., 2007).

Certains auteurs ont rapporté que l'exposition périnatale des souris mères au BPA (0.5 à 10 mg/kg/j s.c.) entraînait, chez la descendance femelle, une puberté précoce, un changement des cycles œstraux, une chute des niveaux plasmatiques de l'hormone gonadotrope lutéinisante (LH), des lésions au niveau de l'utérus et des ovaires et une altération du développement des glandes mammaires (Nikaido et al., 2004; Zhang et al., 2011; Ayyanan et al., 2011). D'autres auteurs ont aussi montré que l'exposition au BPA (2-20 µg/kg/j p.o.) des mères souris pendant la gestation, mènerait chez la descendance mâle à une augmentation du volume de la prostate, un développement de lésions néoplasiques et un déséquilibre dans l'homéostasie de la testostérone (Timms et al., 2005; Ho et al., 2006; Prins et al., 2007). Également, d'autres constatations ont été faites chez ces animaux, soit une diminution de la masse des épидидymes et une baisse de la production spermatique journalière, influençant par la suite la qualité et la viabilité des spermatozoïdes (Zhang et al., 2012).

### II.5.2. Hepato-toxicité

De multiples modèles animaux montrent l'existence d'un lien entre la résistance à l'insuline, l'hyper insulinémie et la stéatose hépatique (Cohen, Horton et al. 2011). En effet, le foie joue un rôle pivot dans la régulation du métabolisme énergétique. Les informations concernant les effets hépatiques du BPA étaient relativement limitées, des travaux très récents ont révélé un impact du BPA sur le foie. Somm et al. (2009) ont montré, chez le rat, que l'expression hépatique des facteurs lipogéniques SREBP-1c, FAS et ACC est augmentée chez les femelles exposées *in utero* à environ 70 µg/kg/j de BPA (Somm et al. 2009). En parallèle, une étude, réalisée sur la lignée d'hépatocytes humains HepG2, montre une accumulation de lipides intracellulaires en réponse à de faibles doses de BPA (10<sup>-12</sup> à 10<sup>-6</sup> M) (Huc, Lemarie

et al. 2012). De fortes doses de BPA (50mg/kg/j) génèrent, chez le rat, une production d'ERO et une répression des gènes anti oxydants (catalase glutathion réductase, glutathion transférase, glutathion peroxydase), provoquant une hépatotoxicité (Hassan, Elobeid et al. 2012). Moon et al. ont montré qu'une exposition aiguë au BPA chez la souris, à une dose inférieure à la NOAEL (1,2 mg/kg/j), peut induire des lésions hépatiques et des dysfonctionnements mitochondriaux par une augmentation du stress oxydant, de l'inflammation et de la peroxydation lipidique. Les transaminases ASAT et ALAT, marqueurs d'une atteinte hépatique, et les niveaux sériques en cytokines inflammatoires IL-6 et TNF $\alpha$  sont fortement élevés, surtout 6 heures après l'injection de BPA (Moon, Kim et al. 2012). Des études, réalisées sur une lignée d'hépatocytes humains (HepG2), confirment ces observations. Une courte exposition à 10 ou 100 nM de BPA provoque une altération de la structure des mitochondries, mais également de leurs fonctions (diminution du taux de consommation d'oxygène, de la production d'ATP, et de la perméabilité membranaire). Ceci est associé à une augmentation du stress oxydant et de l'inflammation (Huc, Lemarie et al. 2012; Moon, Kim et al. 2012).

Asahi et al. ont montré que le BPA induit un stress du RE par la production de ERO dans les cellules hépatiques de type macrophages (Asahi, Kamo et al. 2010). L'activation chronique du stress du RE a un rôle important dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète dans l'obésité (Fu, Yang et al. 2011).

L'étude des voies de signalisation dans le foie de souris gestantes montre que la voie de phosphorylation d'Akt (résidu Thr308) est diminuée suite à une exposition au BPA (10 $\mu$ g/kg/j), reflet d'une insulino-résistance (Alonso-Magdalena, Vieira et al. 2010). Chez le mâle, un traitement au BPA conduit à une surexpression de la protéine IRS-1 et la voie AKT ne semble pas altérée (Batista, Alonso-Magdalena et al. 2012).

### **II.5.3. Effet sur la fonction métabolique**

L'action potentielle du bisphénol A sur le poids corporel et le métabolisme énergétique a été observé dans des études réalisées in vivo chez des rongeurs. Celles-ci ont permis d'explorer l'impact du BPA sur diverses fonctions vitales et les complications métaboliques associées, dont la mise en place de l'obésité, la différenciation des adipocytes, l'accumulation des lipides, le transport du glucose. Elles ont pu aussi associer l'exposition au BPA avec des changements du contenu des cellules  $\beta$ -pancréatiques en insuline et en sécrétion d'adiponectine et de lectine impliquées dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose, cruciaux

pour le maintien d'un poids corporel adéquat (Vom Saal et al., 2012). Une corrélation a été mise en évidence entre l'exposition périnatale au BPA et la variation du poids corporel à l'âge adulte chez des rongeurs ; l'effet obésogène remarqué montre que l'exposition périnatale au BPA (0.1 µg/kg/j et 10 µg/kg/j) augmente la masse corporelle des rats femelles et mâles à l'âge adulte (Rubin et al., 2001). Par ailleurs, une élévation des niveaux plasmatiques de leptine et de cholestérol total a été observé, ce qui peut mener à des perturbations du métabolisme glucidique des lipides et des sucres, contribuant ainsi au développement de l'obésité générale, et présentant un risque de diabète de type 2 insulino-dépendant (Vom Saal et al., 2012).

### **II.5.4. Toxicité thyroïdienne**

Une étude sur des cellules humaines in vitro a mis en évidence la capacité du bisphénol A à perturber la fonction thyroïdienne à l'intérieur des cellules en déplaçant l'hormone thyroïdienne T3 (triiodothyronine) de son récepteur et en inhibant la transcription des gènes, ce qui montre un effet potentiel du BPA comme antagoniste des hormones thyroïdiennes (Moriyama et al., 2002). Une autre étude française de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, qui s'ajoute sur la liste des enquêtes scientifiques autour des effets nocifs du bisphénol A, a montré que l'exposition du bisphénol A de brebis pendant la grossesse entraînait des perturbations de la fonction thyroïdienne chez celle-ci et également chez leurs rejetons. Ces résultats ont été caractérisés par une diminution du taux plasmatique de la thyroxine (T4, l'hormone thyroïdienne), ce qui peut avoir des conséquences négatives sur la croissance, le développement neuronal et cognitif du rejeton (Viguié et al., 2012).

### **II.5.5. Effet sur le cancer du sein**

Des liens avérés ou suspectés ont été établis entre le BPA et l'apparition de cancer du sein (Lamartiniere et al., 2011). De plus l'exposition au bisphénol A a été associée à une augmentation de l'incidence du cancer mammaire (Jenkins et al., 2009). L'exposition fœtale chez les rats à 2.5, 25, 250 et 1000 µg/kg/j de BPA par voie intraveineuse a conduit au développement de lésions pré-néoplasiques et néoplasiques dans la glande mammaire et à une augmentation de tumeurs (Murray et al., 2007). D'autres études ont montré l'apparition de cancers mammaires après une exposition au bisphénol A durant la période prénatale chez des rongeurs (Munoz-de-Toro et al., 2005; Durando et al., 2006).

Les effets identifiés portent sur une modification de la structure de la glande mammaire chez les nouveau-nés, un développement plus avancé dès la naissance caractérisé par une accélération de la maturation des glandes mammaires et une densité plus importante du tissu épithélial de celles-ci. Ceci pourrait favoriser un développement tumoral et des lésions précancéreuses et cancéreuses ultérieurement (Macon et al., 2013).

### **II.5.6.Effet sur les Fonctions cérébrales et comportementales**

Les fonctions cérébrales et comportementales sont également perturbées chez les rats et les souris exposés au BPA *in utero*. En effet, plusieurs études ont mis en évidence une perte du dimorphisme et de caractère sexuel primaire (organes génitaux) ou secondaire (morphologique, physiologique, comportementale, etc.) au niveau des structures cérébrales pour la progéniture exposée à ce contaminant (Cao J et al., 2012). Par ailleurs, de nombreuses publications ont rapporté qu'une exposition des rats au BPA pendant les périodes fœtales et allaitantes à une dose inférieure à la dose journalière tolérable humaine (TDI= 50 µg/kg/j), pourrait induire une toxicité touchant et perturbant le développement, engendrant des modifications structurelles et neurochimiques du cerveau associées à des changements comportementaux (sociaux, sexuels, etc.) comme l'hyperactivité, des déficits d'apprentissage (test mémoire), comportements cognitifs et anxiolytiques ( Kubo et al.,2003 ; Panagiotidou et al.,2014).

Une exposition à l'âge adulte peut conduire à une altération de la mémoire (reconnaissance d'objets et la mémoire spatial) et du comportement exploratoire (Wang Chong et al., 2014). Une déféminisation du comportement social et émotionnel et une altération du comportement maternel sont également observées chez des rongeurs femelles (Gioiosa et al., 2007). Dans l'hypothalamus et le cortex préfrontal, le BPA antagonise l'action de l'oestradiol<sub>2</sub> (E<sub>2</sub>) sur la formation des synapses (synaptogenèse) (Juraska et al., 2013; Rachel et al., 2015).

### III. Stress oxydant

#### III.1. Définition

Le stress oxydant, dénommé également stress oxydatif, se définit comme un déséquilibre de la balance « pro-oxydants/antioxydants » en faveur des oxydants, ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation. Un stress oxydatif peut donc se développer suite à une surproduction des oxydants comme les espèces activées de l'oxygène et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants (Sergent et al., 2000 ; Almasiova et al., 2012).

#### III.2. Radicaux libres biologiques

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) occupant une orbitale externe (Halliwell., 1989), ce qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (Bonfont-Rousselot et al., 2003 ; Finaud et al., 2006). Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voire quelques nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (Exemple :  $\cdot\text{OH}$ ) (Goto et al., 2008).

**Tableau 3.** Principales ERO radicalaires et non-radicalaires((Haton., 2005).

Radicaux libres(nomenclature)	Structure chimique
----------------------------------	--------------------

Radical hydroxyle	$OH \cdot$
Radical hydroperoxyde	$HO O \cdot$
Radical peroxyde	$RO O \cdot$
Radical alkoxyde	$RO \cdot$
Peroxyde d'hydrogène*	$H_2 O_2$
Peroxynitrite *	$ON O O \cdot$
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$

\* Espèce active de l'oxygène, non radicalaire

### III.2.1. Type des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être formés par trois procédés (Evans *et al.*, 2002 ; Chavan et Melinkeri, 2013) :

- Addition d'un électron libre à un non radical :  $NR + e \rightarrow R^{\cdot}$
- Perte d'un électron par un non radical :  $NR - e \rightarrow R^{\cdot}$
- Scission homolytique d'une liaison covalente :  $A-B \rightarrow A^{\cdot} + B^{\cdot}$

Il existe majoritairement deux grandes familles d'espèces réactives : les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives à l'azote (ERN).

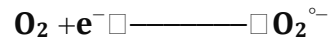
#### III.2.1.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS Reactive Oxygen Species)

Les "espèces réactives de l'oxygène" sont des dérivés de l'oxygène dont certains électrons se trouvent dans un état énergétique excité, donc (très) réactionnel. Certains de ces dérivés portent un électron non apparié (= radical libre) (Tsumbu *et al.*, 2012). Les radicaux libres de l'oxygène incluent les radicaux libres comme l'anion super oxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) et des composés réactifs oxydants non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'oxygène singlet ( $^1O_2$ ).

##### A- Anion super oxyde ( $O_2^{\cdot -}$ )

L'anion superoxyde est formé par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire (Birben *et al.*, 2012). C'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire (Harman, 2000 ; Sisein, 2014). Les différentes enzymes permettant cette réaction sont : la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclo-oxygénases (COX),

les lipo-oxygénases, les oxyde nitrique synthases NOS (Nitric Oxyde Synthases), les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochromes P<sub>450</sub>) et celles de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie (Cai et Harrison, 2000 ; (Birben *et al.*, 2012).



La réactivité du O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est limitée et son action sera plus le résultat des produits beaucoup plus agressifs qui en sont dérivés en particulier le radical hydroxyle (HO•). Cette faible réactivité permet d'ailleurs son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques (Favier, 2003).

### B.Radical hydroxyle (OH)

Les radicaux hydroxyles sont les radicaux libres de l'oxygène les plus réactifs qui peuvent réagir avec l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et sont à l'origine de lésions de nécrose (Favier, 2003). Le radical hydroxyle (OH) peut être induit par la réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon les réactions suivantes :



Il est certainement l'ERO la plus destructrice pour la cellule et ses composants. Malgré une durée de vie très brève et l'impossibilité pour lui de franchir les membranes, il possède une très grande réactivité liée à un potentiel oxydant très élevé (Robineau *et al.*, 2012).

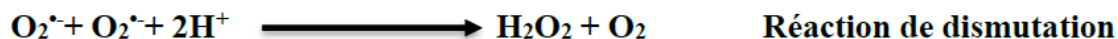
### C.Oxygène singulet (1O<sub>2</sub>)

Il correspond à une forme excitée de l'oxygène O<sub>2</sub>, il possède la même structure électronique que l'oxygène mais 'agencée' différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état 'excité' lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

### D.Radical peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Le radical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est très oxydant il est relativement stable. Il peut traverser les membranes lipidiques. Il est tout de même capable d'oxyder certaines macromolécules biologiques en interagissant avec des métaux de transition (fer et cuivre). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas un radical libre mais a la capacité de générer des radicaux hautement réactifs (Saoudi *et al.*,

2011). Il est généré dans le peroxysoxe, les microsomes et les mitochondries par une réaction de dismutation (Ramirez *et al.*, 2008).



**E- Les radicaux peroxy ROO· :**

Ils font plutôt partie de la « deuxième vague » d'ERO, dans la mesure où leur formation fait suite à une réaction d'oxydation d'acides gras polyinsaturés par d'autres ERO formées préalablement. La partie « R » correspond à un acide gras polyinsaturé. Leur formation comprend 2 étapes principales : la première (réaction 1) correspond à la perte d'un atome d'hydrogène causée notamment par un radical hydroxyl, et la seconde (réaction 2) à la liaison avec une molécule d'oxygène (Mc Michael.2007 ; Powers et Jackson. 2008).



**III.2.1.2. Radicaux libres nitrogènes**

**A-Oxyde nitrique (NO· ; monoxyde d'azote)**

Le monoxyde d'azote est un radical libre ubiquitaire synthétisé à partir de l'arginine grâce à l'action d'enzymes oxyde nitrique synthase (NOS) (Arora, 2002). L'oxyde nitrique est un gaz qui ainsi diffuse bien à travers les membranes. Il est susceptible de réagir avec d'autres radicaux libres pour former des espèces oxydantes : le peroxydinitrite NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Ross *et al.*, 2006 ; Kalender *et al.*,2010).

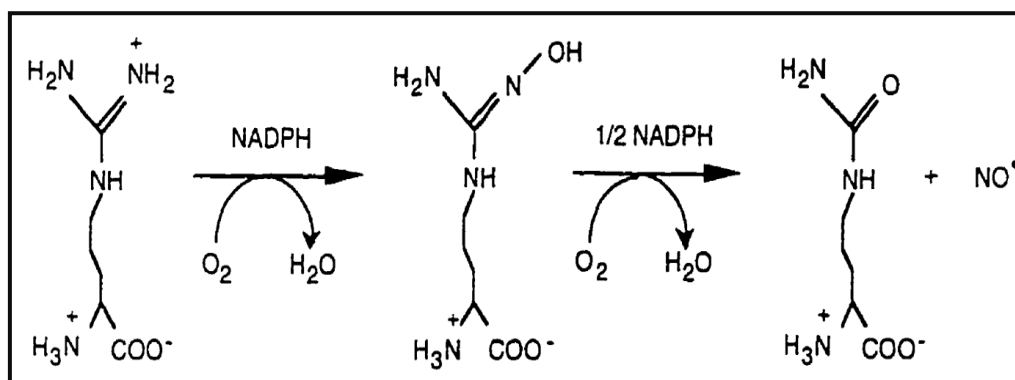
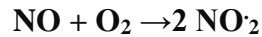


Figure 11 : Réaction de formation du NO à partir de l'arginine (Bédard, 1998).

**B-Dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>.)**

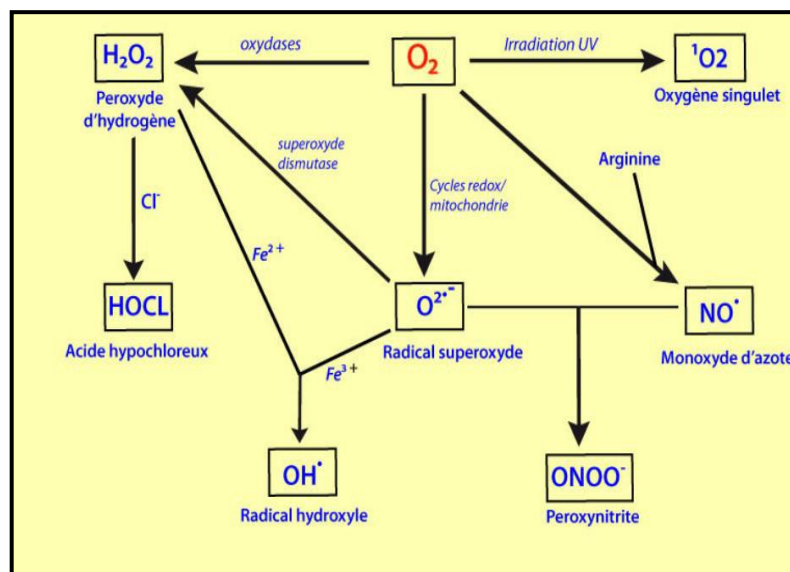
C'est un polluant atmosphérique qui se forme à partir de la réaction du radical peroxyde avec le NO·



Le NO<sub>2</sub>· attaque les doubles liaisons des acides gras non-saturés et transforme ces acides soit de cis-en trans, soit par nitration. Des lipoxygénases transforment l'acide arachidonique en eicosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes ...etc), qui sont des messagers intra et extracellulaires indispensables. Ces réactions créent des radicaux libres. Comme le O<sub>2</sub>·-, NO<sub>2</sub>· peut exister assez longtemps dans les espaces intra membranaires aprotiques (Sisein, 2014).

### C- Peroxyde nitrite (ONOO-)

Le Peroxynitrite est un dérivé d'oxygène très toxique qui provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL. Le ONOO- non radicalaire est instable (durée de vie < une seconde). Il est capable d'oxyder les protéines et les bases azotiques des brins d'ADN par une grande similarité de l'oxydation par le radical hydroxyle (Monocada, 1993). La réaction du NO avec l'anion superoxyde donne naissance au peroxynitrite.



**Figure 12: Mécanisme de production des EROs et ERNs (Boubali, 2017).**

### **III.2.2. Origine des radicaux libres**

Il existe deux origines possibles : endogène et exogène.

#### **III.2.2.1. Origine endogène**

Plusieurs sources sont identifiées et parmi lesquelles la chaîne respiratoire mitochondriale est considérée comme la source majeure des ERO. Au niveau de la membrane des mitochondries, les composés réduits issus du cycle de Krebs (NADH et FADH<sub>2</sub>) sont oxydés, libérant ainsi de l'hydrogène (H<sup>+</sup>) et des électrons. Les électrons sont transférés le long de la chaîne respiratoire au cours des réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène, qui est réduit complètement en H<sub>2</sub>O (Carrière *et al.*, 2006). Les complexes I et III de la chaîne mitochondriale semblent être à l'origine de la fuite des électrons. Ainsi, compte tenu de l'intense activité de la chaîne respiratoire dans les organismes aérobies, la fuite des électrons d'origine mitochondriale semble être la source majoritaire d'EROs dans la cellule, devant les activités de la NADPH oxydase membranaire (Moller *et al.*, 1996 ; Tessier et Marconnet, 2015).

Il y a d'autres sources endogènes physiologiques : Les NADP (H) oxydases sont des enzymes présentes dans la paroi vasculaire et qui génèrent l'O<sub>2</sub> en utilisant NADH ou NADPH comme substrat. L'enzyme xanthine oxydase joue un rôle important dans la production des ERO (particulièrement l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Lors du métabolisme de l'acide arachidonique, ce dernier peut être oxydé soit par les cycles oxygénases (COX), soit par les oxygénases métallo-enzymes à fer pour former des hydro peroxydes (ROOH). La production d'oxydants par les neutrophiles et les macrophages (au cours de l'inflammation) est également une source importante qui dépend de l'activité enzymatique de la NADPH-oxydase. Les ERO peuvent aussi être produits par la NO synthétase (Pincemail, 2002 ; Valko *et al.*, 2006).

#### **III.2.2.2. Origine exogène**

Les radicaux libres exogènes proviennent d'un apport extérieur, c'est-à-dire lors d'une exposition à un environnement toxique. Les rayonnements UV, l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) présents dans notre environnement (goudron, tabac...ect), l'ingestion d'alcool, La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. D'autre part, l'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des NADPH oxydase, NADPH cytochrome réductase et du cytochrome P450 (Robineau et Mercier, 2012)

certaines médicaments anticancéreux et antibiotiques sont responsables de la synthèse de radicaux libres (Basdevant *et al.*, 2006).

### III.3. Stress oxydant et ses conséquences biologiques : Principales cibles biologiques des espèces réactives de l'oxygène

Le stress oxydatif, dû aux radicaux libres, entraîne des dégâts tissulaires essentiellement par l'oxydation des protéines, des sucres, de l'ADN et des lipides (Figure 7)

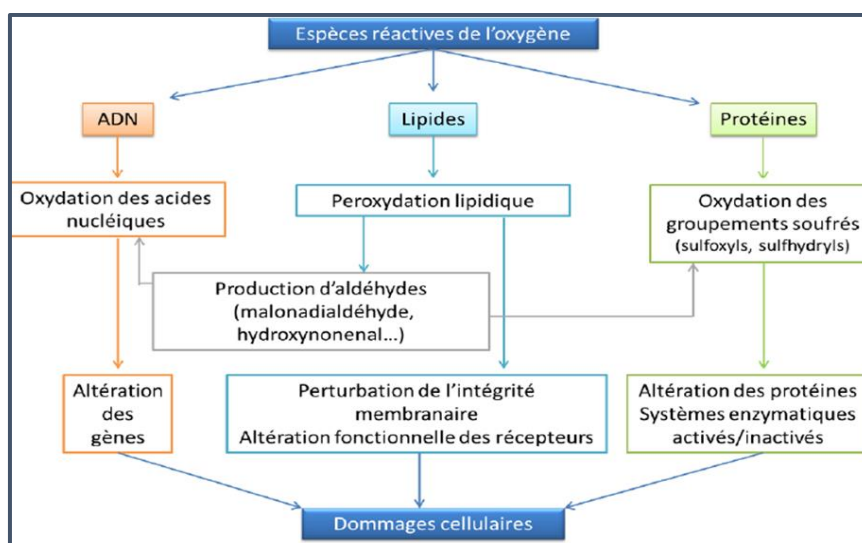


Figure 13 : Les différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène (ERO)(Monteil, 2004).

#### III.3.1. Peroxydation lipidique

L'attaque des lipides concerne les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. Dans le premier cas, l'oxydation des lipides ou des lipoprotéines circulants aboutit à la formation des LDL oxydés qui peuvent être captés par les macrophages et former des dépôts lipidiques de la plaque d'athérome. Dans le second cas, l'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et perturbe le fonctionnement des récepteurs et des transporteurs se trouvant à leur surface (Favier, 2003).

La peroxydation lipidique fournit ainsi une grande variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malonyldialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ont été étudiés comme marqueur de la peroxydation lipidique (Uzunhisarcikli et Kalender 2011 ; Bonnefont-Rousselot et al., 2003 ; Garait, 2006)

### III.3.2. Oxydation des protéines

A cause de leur abondance dans l'organisme, les protéines sont une cible importante des ERO. Les modifications oxydatives des protéines provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine (formation de protéines carbonylées « PC ») (Fetoui et al., 2010).

Ces réactions d'oxydation sont fréquemment influencées par les métaux de transition. Elles peuvent être classées en deux catégories : d'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne peptidique, et d'autre part, les modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE. Il s'ensuit plusieurs types de modifications : fragmentation de la protéine, oxydation des chaînes latérales des acides aminés et formation de liaisons croisées entre deux protéines (El-Khawaga et al., 2012). Ces modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées (Fetoui et al., 2010) et deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées.

### III.3.3. Sucres

En présence de métaux, l'oxydation du glucose peut libérer des céto-aldéhydes, du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et des anions superoxydes ( $OH\cdot$ ), et entraîner la coupure de protéines et leur glycation par attachement du céto-aldéhyde formant un dérivé de produit de glycation avancé (AGE, Advanced Glycation End product) (Barnoud *et al.*, 2007).

### III.3.4. Dommage de l'ADN

Les ADN nucléaires et mitochondriaux constituent une cible cellulaire importante. Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation (Grandjean, 2005). L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées. Cependant le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose (Favier, 2003). En conséquence, l'attaque radicalaire est, en effet, à l'origine de cassures ou d'anomalies chromosomiques, susceptibles de favoriser la cancérogenèse et le vieillissement tissulaire (Favier, 2011). (Figure 11).

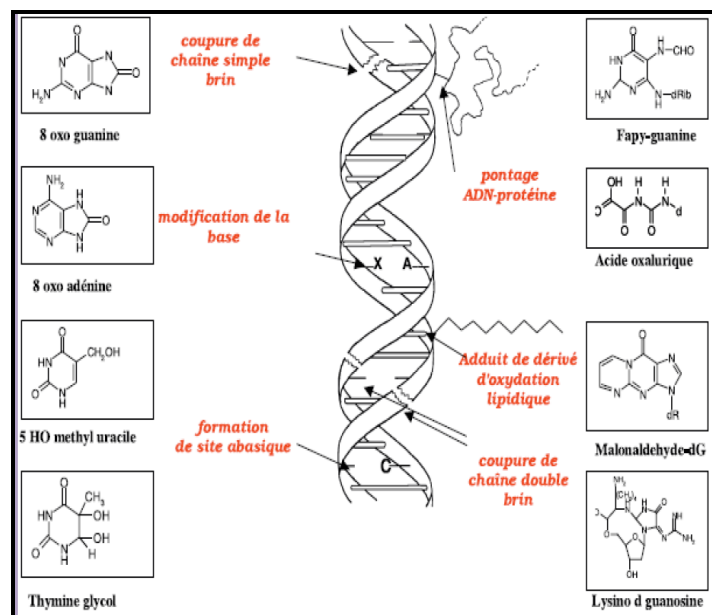


Figure 14 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (d'après Favier, 2003).

### III.4. Système de défense antioxydants

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell, 1990). Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (Delattre et al., 2005). Les stratégies de défense vis-à-vis du stress oxydant sont variées (Figure 10).

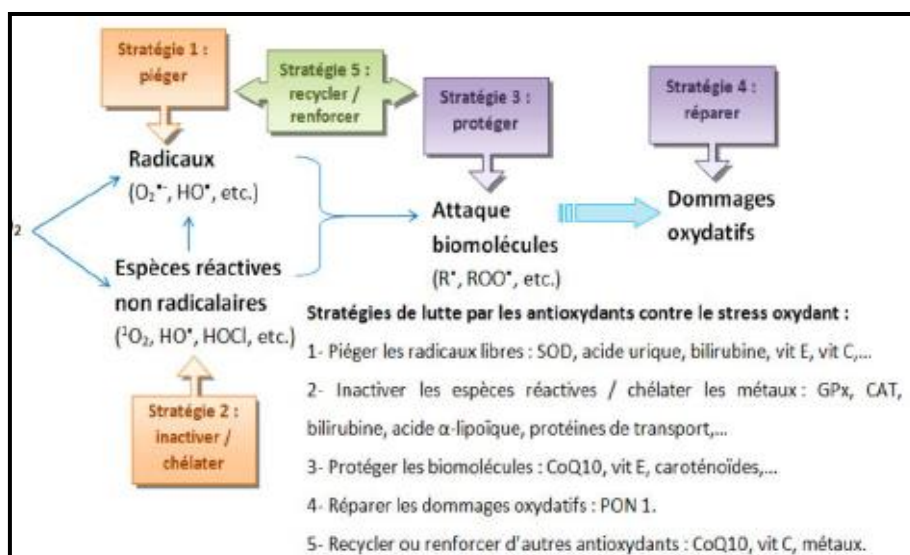


Figure 15: Stratégie de lutte des antioxydants contre le stress oxydant (Grandjean, 2005).

### III.4. 1. Différents types des antioxydants

Il existe deux classes d'antioxydants : les endogènes et les exogènes. Les antioxydants endogènes sont principalement les enzymes superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase dont les mécanismes sont développés plus haut. La deuxième partie permet d'appréhender les antioxydants exogènes qui sont, par définition, apportés de l'extérieur par exemple par l'alimentation.

#### III.4. 1.1. Endogène

##### Les antioxydants enzymatiques

Les enzymes antioxydantes sont les premières lignes de défenses contre les entités oxydantes. Leur rôle est de diminuer la quantité de ROS présentes dans la cellule. Parfois ces enzymes nécessitent des oligo-éléments (Cu, Zn, Mn, Se, Fe) comme cofacteurs pour pouvoir exercer leur activité enzymatique (Auberval., 2010).

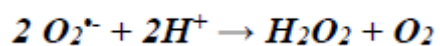
#### a). Les superoxydes dismutases (SOD EC 1.15.1.11)

Les SODs ce sont des métallo-enzymes qui existent sous trois formes dans les tissus des mammifères et qui diffèrent par leurs cofacteurs, leurs emplacements sous-cellulaire et leurs distributions tissulaires.

1. La superoxyde dismutase de cuivre-zinc (CuZnSOD) est présente dans le cytoplasme et les organites de presque toutes les cellules de mammifère. (Laukkanen et al., 2016)

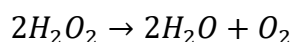
2. La superoxyde dismutase de manganèse (Mn-SOD) ou de fer se trouve dans les mitochondries de presque toutes les cellules (Weisiger et Fridovich,1973 ; Laukkanen et al.,2016).
3. La superoxyde dismutase extracellulaire (ECSOD) est une SOD contenant du cuivre et du zinc. Elle a une grande affinité pour l'héparine et les sulfates d'héparine (Marklund ,1982 ; Laukkanen et al.,2016).

Ces enzymes sont la première ligne de défense contre le stress oxydant en raison de sa capacité de convertir les radicaux superoxydes hautement réactifs en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (Weisiger,1973 ; Valko et al.,2006 ; Laukkanen, 2016), elles catalysent la dismutation de  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  selon la réaction suivante :

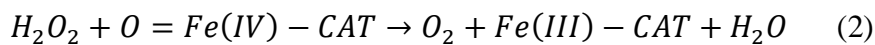
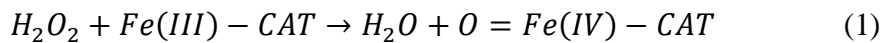


### b). La catalases (CAT : EC 1.11.1.6)

Les Catalases sont des enzymes qui catalysent la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène, Ils se composent de quatre sous-unités protéiques, chacune contenant un groupe hème et une molécule de NADPH. La catalase est particulièrement concentrée dans le foie et les érythrocytes, mais se trouve aussi dans d'autres tissus. Dans la cellule, elle est majoritairement concentrée dans les peroxysomes où elle régule la production de  $H_2O_2$  issue des enzymes oxydases et empêche ainsi sa diffusion hors de l'organite (Valko et al.,2006), Elle possède une activité peroxydase et capable d'utiliser une molécule d' $H_2O_2$  comme substance donneur d'électrons et une autre molécule d' $H_2O_2$  comme oxydant ou accepteur d'électrons (Murray et al ; 2013). Leur fonction principale est de catalyser la décomposition par dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène (Powers et Jackson, 2008).Elle catalyse ainsi la réaction suivante :



Le mécanisme réactionnel met en jeu le fer (III) de chaque groupement hémique. Celui-ci permet la rupture hétérolytique de la liaison entre les deux atomes d'oxygène de l' $H_2O_2$ . Au cours de cette réaction le Fer III est oxydé en Fer (IV)=O (1), puissant oxydant qui va dans une seconde étape oxyder une deuxième molécule d' $H_2O_2$  pour donner une molécule d'eau et une molécule de dioxygène (2) :

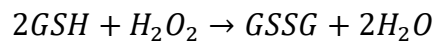


### c).La glutathion peroxydases (GPx :EC 1.11.1.9)

La glutathion peroxydase (GPx) est une sélénoprotéine, formée de quatre sous-unités identiques contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine, elle est présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries (Rahman., 2007).

Des glutathion peroxydases à sélénium sont retrouvées dans le plasma (pGPx), dans le cytosol (cGPx), au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx), et on retrouve une isoenzyme qui est spécifique aux cellules digestives (GIGPx) (Ganther,2014 ;Boubali,2017).

La GPx catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène ou du peroxyde organique (ROOH) en eau ou en alcool, ce processus se produit en présence de GSH, qui est converti en GSSG (glutathion oxydé). Elle assure plus largement la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment de type ROOH, en alcools (ROH) (Valko et al., 2006).



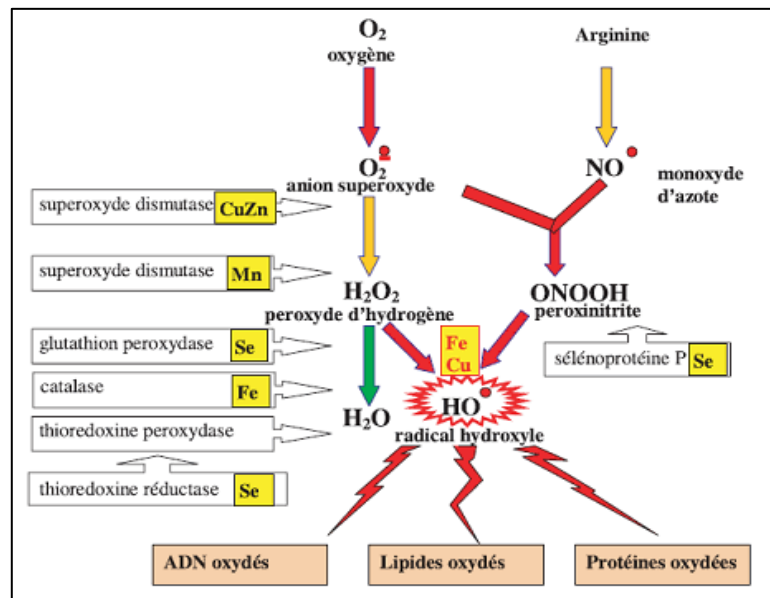
### D).Les Glutathion-S-Transférases (GST, EC 2.5.1.18)

Les GST sont des enzymes sont une famille d'enzymes de détoxification de phase II, qui catalysent la conjugaison du glutathion (GSH) à une grande variété de composés électrophiles endogènes et exogène telles que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou les xénobiotiques et les cancérigènes environnementaux (Nissar et a.,2017). Ils sont divisés en deux groupes : microsomal liés à la membrane et cytosolique, les GST humaines sont répartis en 8 classes selon leurs propriétés structurales (similarité des séquences nucléotidiques). On distinguera ainsi les classes : Alpha ( $\alpha$ ), Kappa ( $\kappa$ ), Mu ( $\mu$ ), Omega ( $\Omega$ ), Pi ( $\pi$ ), Sigma ( $\sigma$ ), Thêta ( $\theta$ ) et Zeta ( $\zeta$ ) (Board et al., 2000 ;Umasuthan et al., 2012 ;Revathy et al., 2012).

### Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR)

Le système thiorédoxine comprend la thiorédoxine (Trx), la thiorédoxine réductase (TrxR) et le NADPH. Les thiorédoxines sont des enzymes à activité antioxydante intrinsèque comme toutes les protéines à groupement thiol (-SH), une fois oxydée, la thiorédoxine sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR), cette dernière

possède un groupement sélénocystéine dans son site actif et elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène (Bouguerne, 2012).



**Figure 16. Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).**

### ✚ Les antioxydants nonenzymatiques :

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (Favier, 2003).

#### a). Le glutathion

Il s'agit d'un tri-peptide qui joue un rôle à de divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydant. Le glutathion (GSH) peut interagir directement avec les espèces oxygénées activées mais il est principalement utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase qui assure l'élimination des lipides peroxydés, il participe au transport des acides aminés à travers la membrane plasmique, piègeur direct du radical hydroxyle et de l'oxygène singulet, et participe dans la régénération des vitamines C et E (Birk et al., 2013 ; Kurutas, 2016).

### b) .L'acide urique

L'acide urique est formé suite à l'oxydation de l'hypo-xanthine et de la xanthine par la xanthine oxydase. Dans les conditions physiologiques, l'acide urique est majoritairement ionisé sous sa forme d'urate ( $\text{UrH}_2^-$ ). Dans le plasma il possède une forte activité de piégeage des radicaux. C'est un puissant piègeur de radicaux  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\cdot$  et  $\text{NOO}\cdot$  (Haleng et al., 2007).

### c).L'acide alpha-lipoïque

L'acide alpha-lipoïque est un acide soufré présent dans toutes les cellules du corps. C'est un puissant antioxydant capable de neutraliser plusieurs types de radicaux libres car l'acide alpha lipoïque est soluble dans l'eau (hydrosoluble) et dans les graisses (liposoluble). En tant qu'antioxydant, c'est un piègeur direct des radicaux libres, il chélate les ions de métaux de transition (par exemple, le fer et le cuivre), augmente les niveaux de glutathion cytosolique et de vitamine C et prévient des toxicités associées à leur perte (Senoglu et al, 2009).

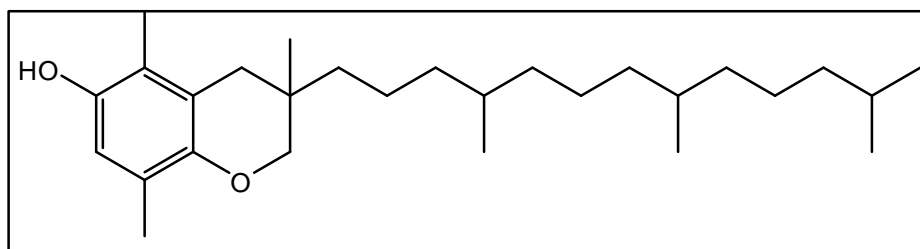
### d). La mélatonine

La mélatonine (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) est un des principaux produits de sécrétion de la glande pinéale dans le cerveau, reconnue pour sa polyvalence fonctionnelle. Dans des centaines d'études, la mélatonine a été documentée en tant que piègeur direct des radicaux libres et antioxydant indirect, ainsi qu'en tant qu'agent immun-modulateur important(Kurutas, 2016).

## II.4. 1.2.Exogène:

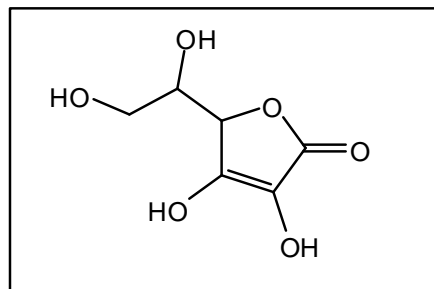
### + les antioxydants naturels

a).**Vitamine E ( $\alpha$  -tocophérol)** : La vitamine E est une vitamine liposoluble qui existe sous huit dérivatifs et dont l'alfa-tocopherols est la forme la plus active chez l'être humain. Dû à son activité antioxydante puissante, elle a été considérée comme l'antioxydant membranaire majeur employé par les cellules. Son rôle antioxydant général est la protection contre la peroxydation lipidique . La vitamine E oxydée pourra être reconvertie principalement par la vitamine C, mais également par d'autres composés comme le GSH, la vitamine A et l'ubiquinol (Delattre *et al.*, 2005).



**Figure 17.** Vitamine E.

**b). La vitamine C (acide L-ascorbique) :** C'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extracellulaires (Haton., 2005). Elle joue un rôle de prévention de l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires, dont elle est considérée comme le plus important antioxydant (Koolman et Röhm, 2004). Elle permet de piéger différentes ERO, et aussi de régénérer la vitamine E (Duarte *et al.*, 2007 ; Powers et Jackson, 2008).



**Figure 18.** Vitamine C

**c). La vitamine A (caroténoïde) :**

La vitamine A agit de manière synergique avec la vitamine E au niveau de la membrane pour piéger les radicaux libres. Elle serait aussi capable de régénérer la vitamine E oxydée. Les caroténoïdes, dont font partie le  $\beta$ -carotène et le lycopène, piègent l'oxygène singulet, grâce à leur structure très riche en doubles liaisons (Haton., 2005).

**d). Les oligo-éléments:**

Le sélénium (Se), le zinc (Zn), Le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), sont des éléments essentiels possédant des propriétés antioxydantes, ils interviennent comme cofacteurs d'enzymes.

Le sélénium est un cofacteur de l'enzyme glutathion peroxydase et autres sélénoprotéines. Il est doué d'activités antioxydantes et anti- carcinogènes. Le zinc et un

cofacteur de l'enzyme superoxyde dismutase, il fonctionne comme un antioxydant dans le corps via la régulation du métabolisme du glutathion et la modulation de l'expression de la métallothionéine. Le manganèse appartient à la superoxyde dismutase (SOD) mitochondriale (Marreiro et al., 2017 ; Stelmach et

### e).Les polyphénols

Plusieurs études récentes ont été réalisées, et ont mis en évidence le rôle protecteur d'une alimentation riche en polyphénols. Chimiquement, ces molécules sont composées par des structures phénoliques caractérisées par un ou plusieurs noyaux aromatiques (la phénylalanine et la tyrosine) qui peuvent être associés à un ou plusieurs groupes hydroxyles (OH) (Sun et al., 2012). Les polyphénols sont des produits secondaires omniprésents, spécifiquement, dans le règne végétal avec des structures très diverses. Les fruits, particulièrement les cerises, forment une source majeure de la gamme variée de composants polyphénoliques (McDougall, 2017). En effet, tous les organes du système végétal en comprennent, ce sont bien répartis allant des racines jusqu'aux fruits (racine, tronc, écorce, tige, feuille, fleur, fruit) (Sun et al., 2012 ; Debbabi et al., 2016). Parmi les polyphénols, il existe des molécules simples, telles que les acides phénoliques, et des structures complexes, formées de plusieurs hydroxyles phénoliques, hautement polymérisées comme les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins condensés (Del Rio et al., 2013).

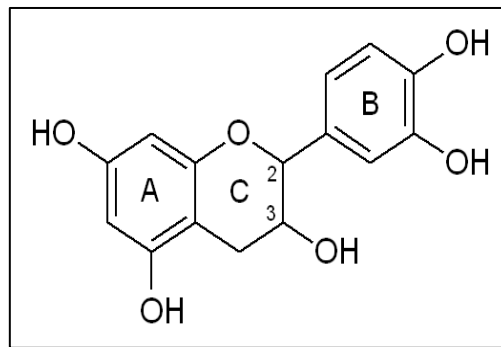
Les polyphénols ont été classés en différentes catégories, selon le nombre et la structure des noyaux phénoliques ainsi que la nature des radicaux qui les lient les uns aux autres. Il existe deux principaux groupes de polyphénols: le groupe des flavonoïdes et le groupe des non-flavonoïdes (Tableau 03)

**Tableau 04: Les deux groupes de polyphénols (Defraigne JO & Pincemail J, 2008)**

Polyphénols	Familles	Principaux composés	Origines
Flavonoïdes	Flavonols	Quercétine	Câpre, piment chocolat, oignon
	Flavones	Apigénine	Persil, romarin, camomille
	Flavanones	Naringénine	Agrumes
	Flavone-3-ols	Catéchine	Thé vert
	Isoflavones	Génistéine	Soja
	Anthocyanidines	Cyanidine	Fruits rouges, raisin
	Tannins hydrosolubles ou non	Polyphénols de hauts poids moléculaire	Plantes supérieures
Non-Flavonoïdes	Acide hydroxy-benzoïques	Acide vanillique	Vanille
		Acide gallique	Feuilles de thé
	Acides hydro-cinnamiques	Acide caféique	Café
		Acide férulique	Riz, blé, asperges
		Acide cholinerigique	Pelure de pomme de terre, de pomme, d'artichaut
	Stilbènes	Resvératrol	Raisin, vin
	Lignines	Lignane	Bois

### a) Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. Les flavonoïdes partagent une structure commune C6 – C3 – C6 du noyau. Celle-ci est formée de deux noyaux aromatiques, indiqués comme  $\alpha$  et  $\beta$  reliés entre eux par trois atomes de carbones formant un hétérocycle oxygéné nommé le noyau  $\gamma$  (Figure 1 4).

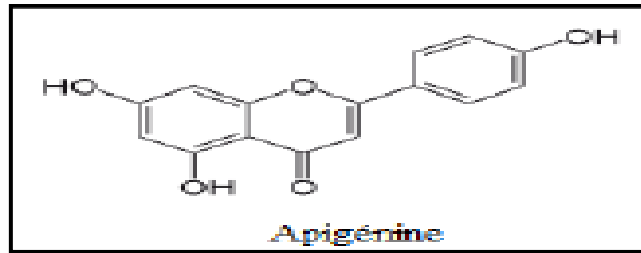


**Figure19:Structure de base des flavonoïdes**

Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C, 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés ; flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (Del Rio et al., 2013 ; Santhakumar et al., 2018)

### - Les flavonoïdes (Flavones) : Apigénine

L'apigénine (Figure 16) appartient à la grande famille des flavones, une sous-classe des flavonoïdes connus pour leurs bénéfices pour la santé. En effet, cette molécule présente des activités anticancéreuses *in vivo* (Birt et al., 1997) ainsi que des effets antiallergiques, antimicrobiens, antiviraux et anti-inflammatoires qui sont principalement présent dans le persil (Justesen et al., 1998) qui est également beaucoup consommé dans le régime méditerranéen, principalement au Moyen-Orient où il est utilisé dans la médecine traditionnelle (Farzaei et al., 2013).



**Figure 20: Structure chimique d'un exemple de flavonoïdes comme l'Apigénine**

Ce flavone se trouve aussi dans le thym, le romarin, le céleri et la camomille. Il est également présent dans le miel (Khalil et al., 2010) et dans l'huile d'olive (Ricciutelli et al., 2017). L'apigénine est particulièrement reconnue pour ses effets antioxydants et antimutagènes *in vitro* (Kuo et al., 1992 ; van Acker et al., 1996) en agissant favorablement sur les enzymes impliquées dans la mort cellulaire, ainsi que dans les phénomènes de réplication de l'ADN. De plus, cette molécule est capable de moduler la transmission GABAergique et glutamatergique dans les neurones corticaux en culture (Losi et al., 2004). Des études réalisées sur l'Homme ont montré que le mode d'absorption de l'apigénine, contenue entre autre dans le persil, diffère d'un individu à un autre (Nielsen et al., 1999).

# **Matériels et méthodes**

### I. Matériels et méthodes

#### I.1. Matériel biologique

Dans notre étude, nous avons utilisé 25 rats blancs mâles (*Albinos wistar*), provenant de l'institut pasteur d'Alger. Agés de 10-12 semaines avec un poids de  $220 \pm 20$  g, les animaux sont élevés au niveau de l'animalerie du département de Biologie, Université Badji Mokhtar – Annaba. Ils ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie ; à une température de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  et une photopériode de 12 h/12 h.

Les rats étaient logés dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée une fois tous les deux jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont été nourris avec un concentré énergiquement équilibré sous forme de croquettes (aliments secs en bouchons) (ONAB, Bejaia). L'eau de boisson est servie dans des biberons *ad libitum*, et renouvelée quotidiennement.

#### I.2. Matériel chimique

##### I. 2.1. Le Bisphénol A

La première molécule utilisée dans cette expérimentation est le bisphénol A. (pureté >99%), a été commandé auprès de *Sigma Chemical Co* (St Louis, France).

##### I.2.2. L'Apigénine

L'**Apigénine (API)** est un composé chimique (**Figure 16**) appartenant à la grande famille des flavones, une sous-classe des flavonoïdes connus pour leurs bénéfices pour la santé. En effet, cette molécule présente des activités anticancéreuses *in vivo* (**Birt et al., 1997**) ; ainsi que des effets antiallergiques, antimicrobiens, antiviraux et anti-inflammatoires qui sont principalement présent dans le persil (**Justesen et al., 1998**) qui est également beaucoup consommé dans le régime méditerranéen, principalement au Moyen-Orient où il est utilisé dans la médecine traditionnelle (**Farzaei et al., 2013**).

Ce flavone se trouve aussi dans le thym, le romarin, le céleri et la camomille. Il est également présent dans le miel (**Khalil et al., 2010**) et dans l'huile d'olive (**Ricciutelli et al., 2017**).

Tableau 05 : Les caractéristiques physicochimiques de l'API

Paramètres	valeurs
Formule brute	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> [Isomères]
Masse molaire <sup>1</sup>	270,2369 ± 0,0142 g/mol
T° fusion	347,5 °C <sup>2</sup>
Solubilité	183 mg·L <sup>-1</sup> (eau, 25 °C) <sup>2</sup>
Pression de vapeur saturante	1,01×10 <sup>-10</sup> mmHg (25 °C) <sup>2</sup>
C	66,67 %, H 3,73 %, O 29,6 %,

### I.3. Traitement des animaux

Après une période d'adaptation de deux semaines, les rats ont été répartis au hasard en 5 groupes de 5 rats chacun. Les rats ont été traités quotidiennement pendant 30 jours par voie orale (gavage) à l'aide d'une sonde gastrique à raison de 10 mg/kg/l de BPA et à l'APG à raison de 20 mg/kg/l. Les solutions mères ont été préparées extemporanément dans l'eau MilliQ.

Le protocole de traitement est illustré dans la figure 20 et selon les lots expérimentaux suivant :

- **Groupe 1** : Rats témoins recevant l'eau de robinet pendant 30 jours.
- **Groupe 2** : des rats traités par le BPA dissout dans l'eau distillée à raison de 1 mg/kg de poids corporels pendant 30 jours.
- **Groupe 3** : rats traités par le BPA dissout dans l'eau distillée à raison de 10 mg/kg de poids corporels pendant 30 jours.
- **Groupe 4** : rats traités par le BPA avec la même dose que celle du groupe 2 avec supplémentations quotidiennes de 20 mg/kg de poids corporels d'Apigénine pendant 30 jours.
- **Groupe 5** : rats traités par le BPA avec la même dose que celle du groupe 3 avec supplémentations quotidiennes de 20 mg/kg de poids corporels d'Apigénine pendant 30 jours.

## Partie expérimentale

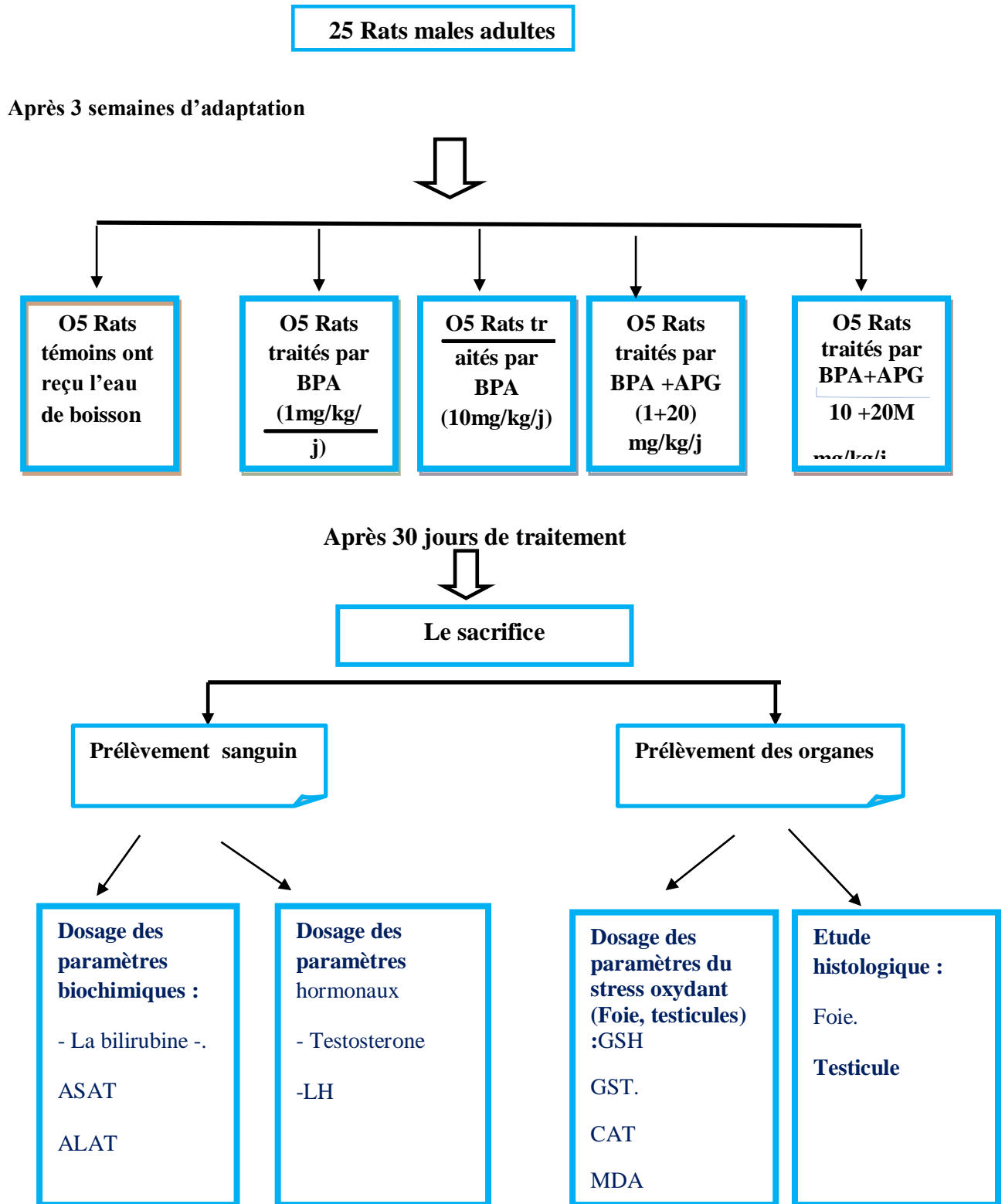


Figure 21 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

### **I.4. Prélèvements des échantillons**

#### **I.4.1. Prélèvement sanguin**

Après 30 jours de traitement les rats composant les cinq groupes sont sacrifiés par dislocation cervicale, le sang est immédiatement recueilli dans des tubes secs étiquetés, puis centrifugés à 3000 tours/min pendant 15 minutes. Le sérum est séparé en trois fractions dans des tubes eppendorfs et stockés au congélateur à une température de (-20° C) jusqu'au moment de dosage.

#### **I.4. 2. Prélèvement des organes**

Après la dissection, le foie et les testicules sont soigneusement prélevés, rincés avec du NaCl à 0.9% puis pesés pour déterminer leur poids absolu. Ils ont été stockés selon deux méthodes : la moitié est stockée au congélateur pour la préparation ultérieure de l'homogénat qui a servi au dosage des paramètres du stress oxydant, l'autre moitié fixée dans la solution de formol à 10% afin de réaliser des coupes histologiques.



Figure 22 : Gavage des rats

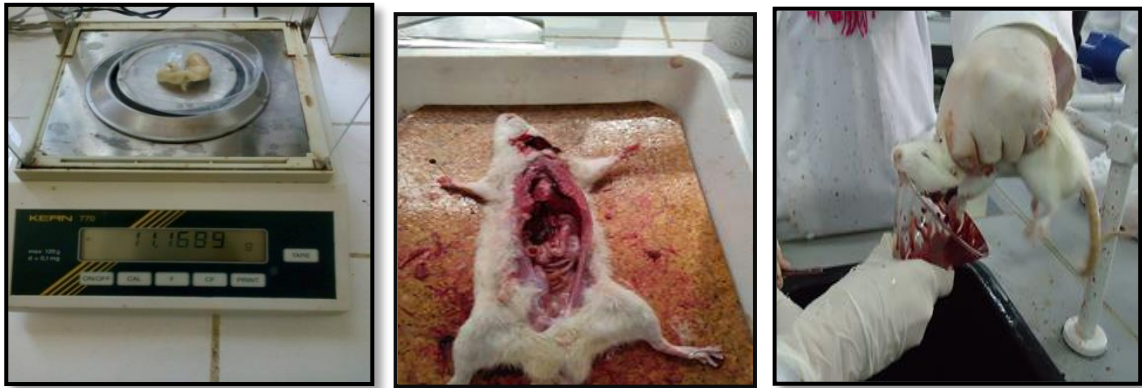


Figure 23 :Le sacrifice et la dissection des rats

### I.5. Exploration de la fonction hépatique

#### I.5.1. Dosage de la bilirubine totale et directe

Le dosage de la bilirubine a été réalisé par la méthode colorimétrique selon la fiche technique (Spinreact).

La bilirubine est convertie en azobilirubine coloré par l'acide sulfanilique diazotété mesuré par la méthode photométrique. Les deux fractions de bilirubine présents dans le sérum, bilirubine-glucuronide et bilirubine libre sont liés à l'albumine, seulement la bilirubine-glucuronide réagit directement dans la solution aqueuse (la bilirubine directe). Tandis que la bilirubine libre exige la solubilisation avec le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour réagir (la bilirubine indirecte). Dans la détermination de la bilirubine indirecte, la directe est également déterminée, les résultats correspondent à la bilirubine totale.

## Partie expérimentale

---

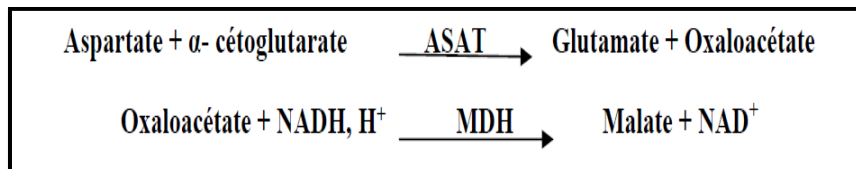
L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de bilirubine dans l'échantillon (Kaplan et al., 1984).

### I.5.2. Dosage de l'activité d'aspartate aminotransférase ASAT (TGO)

Le dosage de l'activité d'aspartate aminotransférase a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique (Spinréact).

#### • Principe

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi l'oxaloacétate de glutamate transaminase (TGO) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au  $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H<sup>+</sup> (Murray, 1984) selon la réaction ci-dessous :

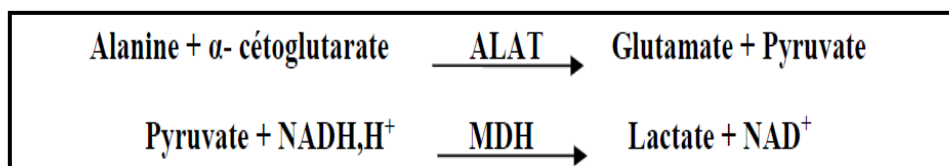


La diminution de la concentration en NADH est directement proportionnelle à l'activité enzymatique d'aspartate aminotransférase dans l'échantillon (Murray, 1984).

### I.5.3. Dosage de l'activité d'alanine aminotransférase ALAT (TGP)

#### • Principe

L'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi le pyruvate de glutamate transaminase (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au  $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au lactate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H<sup>+</sup> (Murray, 1984). Ce principe est présenté selon la réaction suivante :



La diminution de la concentration en NADH est directement proportionnelle à l'activité enzymatique d'alanine aminotransférase dans l'échantillon (Murray, 1984).

### **I.6. Exploration de la fonction reproductrice (Dosage hormonal)**

Le dosage des paramètres hormonaux a été accompli au sein d'un laboratoire d'analyses médicales à Annaba

#### **I.6.1. Dosage de la testostérone**

- **Principe**

Le test immuno-enzymatique sur phase solide (ELISA) est basé sur le principe de compétition. La quantité inconnue d'antigènes présente dans l'échantillon et une quantité fixe d'antigènes conjugués à une enzyme entrent en compétition pour les sites de fixation des anticorps coâtés 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.

- **Calcul des résultats**

Les densités optiques (DO) des étalons 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 présentant une concentration supérieure à celle de l'étalon le plus concentré doivent être dilués de la façon décrite dans les préparations

Préalables au test et testés de nouveau. Les résultats des échantillons ayant été pré-dilués doivent être multipliés par le facteur de dilution appliqué. Les concentrations sont exprimées en ng/ml

### **I.6.2. Dosage de la LH**

- **Principe**

Le dosage de la LH plasmatique a été effectué par la méthode ELISA : Enzyme-Linked-immunosorbant-assay (Kujlin et al., 1990) utilisant un kit Boehringer pour système ES 22. Cette méthode repose sur le principe sandwich, elle emploie deux types d'anticorps: un anticorps monoclonal anti-LH et anticorps marqué à une enzyme (anticorps anti-LH marqué à la peroxydase)

### **I.6.3. Détermination de la concentration de spermatozoïdes dans l'épididyme**

L'épididyme de rats a été coupé et dilué dans 1 ml de la solution préparée à partir d'eau distillée (100 ml), dans laquelle 0,008 g de pénicilline, 0,001 g de pyruvate de sodium et 0,210 g de bicarbonate de sodium ont été ajoutés à l'échantillon dilué mélangé. Ensuite, une goutte du surnageant a été déposée au centre de l'hémocytomètre de la cellule de Malassez. Le nombre de spermatozoïdes a été déterminé en comptant les spermatozoïdes présents dans 10 des 25 carrés de la chambre. La valeur obtenue a été multipliée par un million.

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

#### **I.7.1. Préparation de l'homogénat**

Un gramme de foie, testicules de rats récupérés à partir des cinq lots étudiés, ont été broyés. Après homogénéisation des tissus dans 2 ml de solution tampon phosphate (TBS : Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) à 1 :2 (P/V), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, 4°C, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs est conservé -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydant.

#### **I.7.2. Dosage des protéines tissulaires**

Les protéines tissulaires ont été quantifiées selon la méthode colorimétrique de Bradford (1976) qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie G250 (BBC) comme réactif et l'albumine de sérum de boeuf (BSA) comme standard. Le BBC réagit avec les groupements amines (-NH<sub>2</sub>) des protéines pour former un complexe de couleur bleue. L'apparition de cette couleur reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité établit la concentration des protéines qui est mesurée spectrophotométriquement à 595nm.

## Partie expérimentale

### • Mode opératoire

Prélever 0,1 ml de l'homogénat.

- Ajouter 5 ml du réactif de Bradford.
- Agiter et laisser reposer 5 min pour la stabilisation de la couleur.
- Lire la densité optique à 595 nm, contre le blanc (H<sub>2</sub>O à la place de l'homogénat).
- La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée.

### • Calcul de la concentration des protéines :

La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée. La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1 mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions (annexe).

### I.7.3. Détermination du taux de glutathion réduit (GSH)

Le glutathion est un thiol intracellulaire le plus abondant présent dans toutes les cellules animales.

#### • Principe

Ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-marcapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque par les groupements (-SH) du glutathion.

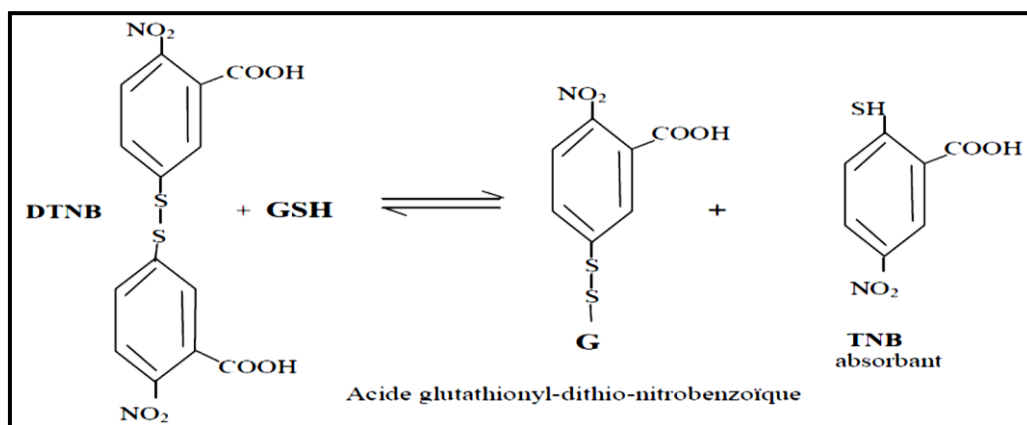


Figure 24: Principe de dosage du glutathion

## Partie expérimentale

---

### • Mode opératoire

La procédure expérimentale du dosage du glutathion est la suivante :

- ✓ Prélever 0.8 ml de l'homogénat + 0.2ml de la solution d'acide salicylique (0.25%)
- ✓ Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace
- ✓ Centrifuger à 1000 tours /min pendant 5min
- ✓ Prélever 0.5ml du surnageant
- ✓ Ajouter 1 ml du tampon Tris-NaCl, pH 7.4
- ✓ Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M.

Laisser pendant 5min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc réactif.

### Calcul de la concentration :

La concentration du GSH est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH } (\mu\text{mol/mg proteines}) = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13.100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg proteines}}$$

- **DO** : La densité optique
- **1** : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation (0.8ml homogénat, 0.2ml SSA).
- **1.525** : volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1ml tris + 0.025 ml DNTB).
- **13.100** : Coefficient d'absorbance (concernant le groupement –SH à 412 nm).
- **0.8** : Volume de l'homogénat après déprotéinisation.
- **0.5** : Volume de surnageant trouvé dans 1.525 ml.

### • Préparation des solutions tampons

➤ **Tampon Tris-EDTA** : Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) à 0,4M et EDTA à 0,02M, on dissout 19,382g de Tris et 2,976g d'EDTA dans 400ml d'eau distillée. Le pH doit être ajusté à l'aide d'un pHmètre à 9,6 en ajoutant l'HCl (acide) ou le NaOH (base).

➤ **Solution SSA** : On dissout 0,063g d'acide sulfosalicylique dans 25ml d'eau distillée.

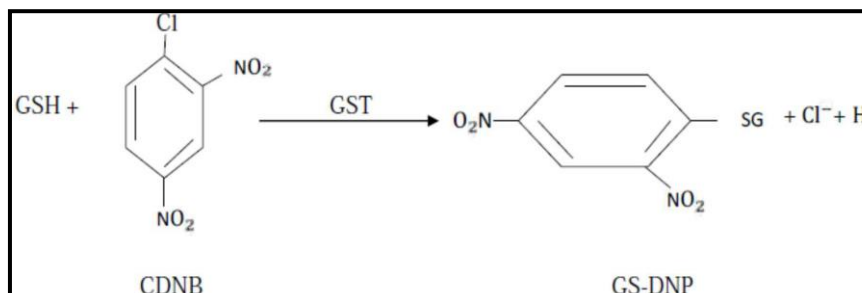
➤ **Solution DTNB 0,01M** : Dissout 0,0594g dans 15ml de méthanol absolu.

### I.7.4. Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST)

Les glutathion S-transférases appartiennent à une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques, impliqués dans le transport et la biosynthèse intracellulaire. Elles catalysent des réactions de conjugaison entre un peptide endogène, en présence d'un cofacteur le glutathion, et des molécules réactives comportant des sites électrophiles. La conjugaison entraîne la formation d'une molécule nouvelle ; 1- S- Glutathionyle 2- 4 Dinitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST.

#### • Principe

La mesure de l'activité de la glutathion-S- transférase (GST) est déterminée selon la méthode de Habig et *al.*, (1974). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro2,4 di nitrobenzene) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH), la conjugaison entraîne la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyl 2-4 Dinitrobenzene permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante :



#### • Mode opératoire

Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0.1M, pH6). L'homogénat est centrifugé à 1400 t /min pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes. Le dosage consiste à faire réagir 200 µl du surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB. La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 340nm dans un spectrophotomètre UV/visible contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité du surnageant.

## Partie expérimentale

Tableau 06: Protocole utilisé pour le dosage du GST

Réactifs	Blanc ( $\mu$ l)	Echantillon ( $\mu$ l)
Tampon phosphate (0.1M) pH 6.5	850	830
CDNB (0.02 M)	50	50
GSH (0.1 M)	100	100
Homogénat	.....	20

### • Calcul de l'activité de la GST

L'activité de la GST exprimée en nanomoles de C-DNB par minute par milligramme de protéines (nmol C-DNB/min/mg prot) selon la formule suivante :

$$\text{GS T (nmol C-DNB/min/mg prot)} = \frac{\Delta \text{ DO échantillon} - \Delta \text{ DO Blanc}}{\varepsilon \times L \times \text{mg pro}}$$

▪  $\Delta \text{ DO échantillon} - \Delta \text{ DO blanc}$  : moyenne des DO des échantillons par minute – moyenne des DO des Blancs par minute ;

▪  $\varepsilon$  : Coefficient d'extinction moléculaire du C-DNB,  $\varepsilon_{\text{C-DNB}} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ;

▪ L : Trajet optique de la cuve = 1cm. □

### Préparation des solutions tampons

✚ **Tampon phosphate (0.1 M) pH 6.5** : de la même façon que celui de pH 7.4 juste on réglee pH à l'aide du pH mètre à 6.5 par l'ajout du HCl.

✚ **Solution CDNB (0.02M)** : Dissoudre 202,55 mg CDNB dans 50 ml d'éthanol absolu.

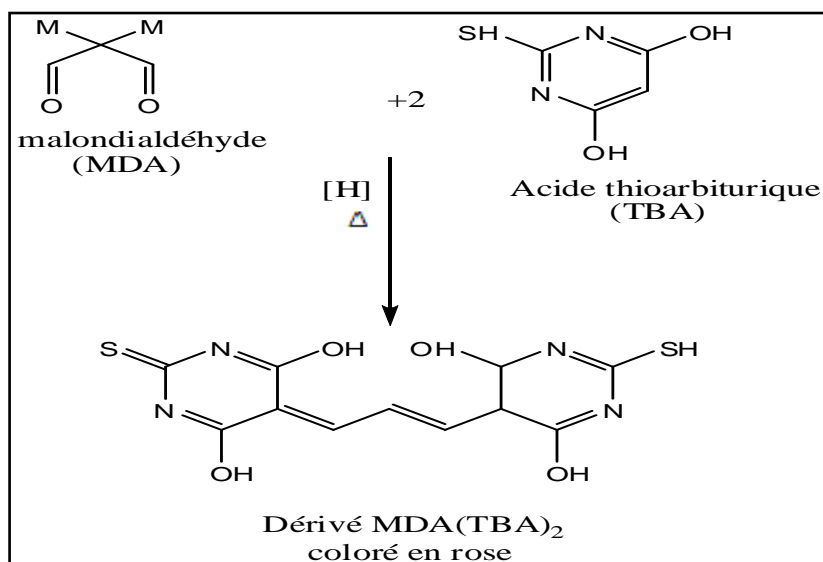
✚ **Solution GSH (0.1M)** : Dissoudre 153,65 mg GSH dans 50 ml d'eau distillée.

### I.7.5. Détermination du taux de malondialdéhyde (MDA)

Le MDA est l'un des produits des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène, générées par certains contaminants. Dans notre étude, le niveau de la peroxydation lipidique a été évalué par le dosage des TBARS d'après la méthode de [Buege et Aust \(1978\)](#), dans le rein, le foie et le cerveau.

#### I.7.5.1. Principe

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique. La réaction entraîne la formation d'un complexe, de couleur rose entre deux molécules d'acide thiobarbiturique, qui peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm.



**Figure 25.** Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.

- Mode opératoire :
  - Prélever 375  $\mu$ l de l'homogénat.
  - Ajouter 150  $\mu$ l de la solution tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM pH 7.4)
  - Ajouter 375  $\mu$ l de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%).
  - Agiter et centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min à 4°C.
  - Prélever 400 $\mu$ l du surnageant
  - Ajouter 80 $\mu$ l du HCl (0.6 M)
  - Ajouter 320  $\mu$ l de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM).
  - Mélanger et incubé au bainmarie à une température de 80°C pendant 10 min.

Les densités optiques sont mesurées à 530 nm contre le blanc réactif.

## Partie expérimentale

- Calcul de la concentration du MDA :

La quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nmol/gramme de protéine.

Selon l'équation :

$$\text{MDA (nmol/mg protéines)} = \frac{\text{DO} \times 10^6}{\text{E} * \text{X} * \text{L} * \text{F}_d}$$

- **C** : Concentration en nmol/mg de protéines.
- **DO** : Densité optique lue à 530 nm.
- **E** : Coefficient d'extinction molaire du MDA =  $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .
- **L** : Longueur du trajet optique = 0.779 cm.
- **X** : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).
- **F<sub>d</sub>** : Facteur de dilution :  $F_d = 0.2083$ .

### I.7.6. Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

- Principe :

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi, 1984).

La réaction se fait en deux étapes. La réaction bilan est :



L'activité de la CAT est mesurée à 240nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Mode opératoire :

Le mode opératoire a été réalisé comme suite :

Réactifs	Zéro (µl)	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate (PBS) (100mM, pH 7.4)	1000	800	780
$\text{H}_2\text{O}_2$ (0.500 mM)	-----	200	200
Homogénat	-----	-----	20

## Partie expérimentale

---

La quantité de surnageant est déterminée en fonction de la quantité de protéine qui doit être comprise entre 1 et 1,5 mg/ml, soit une quantité de 10 à 20 µl de surnageant dilué. Ensuite, la lecture de l'absorption à 240 nm se fait après 15 secondes de délais et du durant 60 secondes de mesure.

- Calcul de l'activité enzymatique :

L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en micromoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par minute par milligramme de protéines (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg prot) selon la formule suivante :

$$\text{Catalase } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg proteins}) = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min}}{\varepsilon \times L \times X \times \text{Fd}}$$

- **ΔDO** : Variation de la densité optique par minutes.
- **ε** : Coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée, ε H<sub>2</sub>O = 0.043 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.  
1 = 0,043 µmol cm<sup>-1</sup>ml<sup>-1</sup>.
- **L** : Largeur de la cuve= 1 cm
- **X** : Quantité de protéines en mg/ml
- **Fd** : Facteur de dilution pour le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la solution tampon

### I.8.Étude histopathologique

L'étude histologique des organes cible à savoir le foie et les testicules a été réalisé selon la méthode décrite par Houlot (1984). Le foie et testicules prélevés ont été soigneusement lavés dans du tampon phosphate et d'emblée, ils sont conservés dans le formol (10 %). les fragments d'organes ont été déshydratés et inclus dans de la paraffine pour pouvoir les coupés en pièces de 5µm selon les étapes décrite ci-après :

✚ Déshydratation :la première étape de déshydratation consiste à remplacer l'eau présente dans les organes par de l'éthanol 100%, lequel sera ensuite substitué par du toluène qui lui-même sera remplacé par de la paraffine. Elle s'effectué par immersion dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (de 70°, 95 et 100°).

✚ Inclusion en paraffine des tissus : Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. En effet les tissus sont inclus dans des blocs de paraffine. Des tranches de section de 5 µm d'épaisseur seront ensuite réalisées grâce à un microtomequi permet de trancher le bloc à l'épaisseur désirée.

## Partie expérimentale

---

✚ Déparaffinage : il consiste à éliminer la paraffine, les lames sont placées sur une plaque chauffante (à 45-60°C) pendant 15 min, afin d'obtenir la liquéfaction et donc l'élimination de la paraffine.

✚ Réhydratation : en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés décroissant (de l'alcool à 100° jusqu'à l'alcool 50°), puis dans l'eau distillée.

✚ Coloration avec la combinaison entre deux colorants hématoxyline et éosine (HE)

Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100ml d'eau distillée + 2 ml d'ammoniaque) et solution d'Eosine

✚ La coloration suit les étapes suivantes : déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée. Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).

✚ Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ; déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.

✚ Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.

✚ Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

✚ Observation : les coupes ont été observées au microscope optique Leica DM720 doté d'un système de traitement d'image Las Ez 3.2.

### I.9. Etude statistique

Les résultats ont été représentés sous forme de moyennes avec leur écart-type (Moy ± écart-type). Le traitement statistique des résultats est exploité en réalisant une analyse de variance à un facteur (ANOVA), le test de Tukey a été utilisé pour comparer les groupes. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel statistique Minitab 17.1 et Excel 16.0 (Microsoft, Inc.). Le niveau de signification statistique était fixé à  $p \leq 0,05$

Nous avons effectué deux comparaisons :

➤ Les groupes traités (BPA1mg, BPA10mg, BPA1mg+API et BPA10mg+API) par rapport au groupe témoin :

✓ \* : Différence significative ( $p \leq 0.05$ ) ;

✓ \*\* : Différence hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) ;

## *Partie expérimentale*

---

✓ \*\*\* : Différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ).

➤ Les groupes traités (BPA1mg+API et BPA10mg+API) par rapport au groupe traité (BPA1mg et BPA10mg)

✓ # : Différence significative ( $p \leq 0.05$ ) ;

✓ ## : Différence hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) ;

✓ ### : Différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ).

- Avec p : Seuil de signification

## **Résultats et discussion**

## **II. Résultats**

### **II.1. Effet du BPA et de la supplémentation de l'API sur les paramètres physiologiques, biochimiques et hormonaux**

#### **II.1.1. Action sur la croissance corporelle**

Nos résultats montrent une diminution du poids corporel chez les rats traités par le BPA et chez les rats traités par la combinaison BPA/API par rapport au groupe témoin (tab07., fig 26.). On note une différence hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) après l'exposition au BPA à raison de 10 mg/kg PV et une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) chez le groupe traité par le BPA (1mg) par rapport au témoin.

#### **II.1.2. Action sur le poids absolu du foie et testicules**

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) du poids absolu du foie chez les rats traités par le BPA à raison de 1mg/kg et 10mg/kg de poids corporel comparant au groupe témoin. Alors que, chez les rats traités par la combinaison BPA/API, on enregistre une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) du poids absolu du foie comparant aux lots traités par le BPA.

Concernant les groupes traités par la combinaison BPA1mg+API et BPA10mg+API, on constate une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) du poids absolu du foie API par rapport aux groupes traités par le BPA. Aussi bien on trouve une diminution significative du poids absolu de testicules ( $p \leq 0,05$ ) chez les rats traités par le BPA(10mg/kg) et les rats traités par la combinaison BPA10mg/API comparativement au groupe témoin.

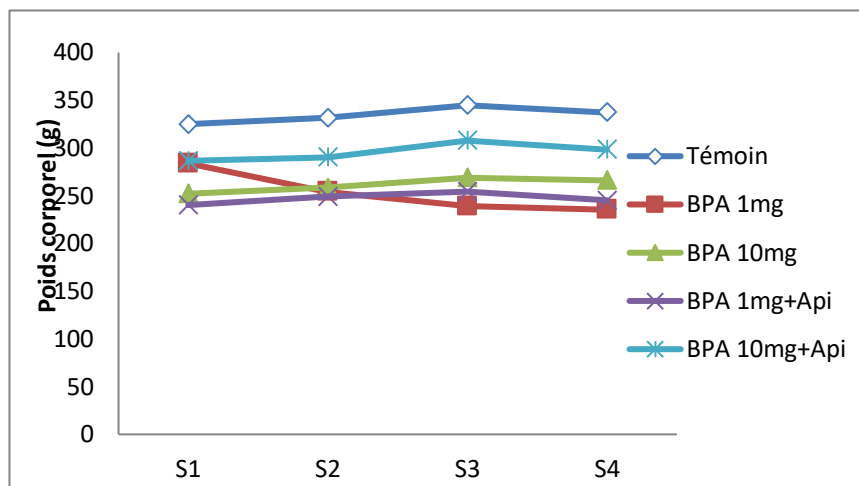
**Tableau 07 : Variation de poids corporel PC (g), poids absolu (g) du foie, de testicule chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement.**

Parameters	Lots expérimentaux				
	Témoin	BPA 1mg	BPA 10mg	BPA 1mg+API	BPA 10mg+API
<b>Poids corporel(g)</b>	323.4±5.60	286±6.30*	260±5.10**	242± 4.90 <sup>#</sup>	287.2±7.20
<b>Poids absolu du foie</b>	7.46±0.93	5.46±0.82*	5.40±0.87*	7.01±0.93 <sup>#</sup>	6.69±1.08 <sup>#</sup>
<b>Poids absolu des testicules</b>	2.63± 0.13	2.38±0.19	1.53±0.17*	2.43±0.21	1.96±0.12* <sup>#</sup>
<b>Nombre Spz</b>	89.61± 6.35	55.39±4.80*	31.85± 3.60**	61.13± 7.20*	46.08± 5.1* <sup>#</sup>

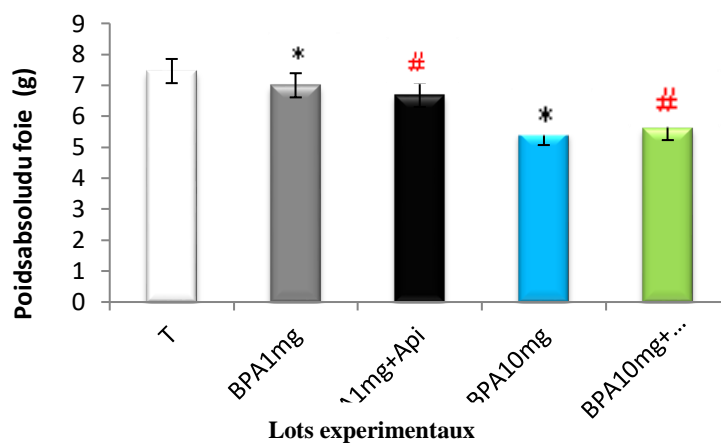
\*\*P <0,01 ; \*P<0,05 : Différence significative comparant au groupe témoin.

<sup>##</sup>P <0,01 ; <sup>#</sup>P < 0,05 : Différence significative comparant au groupe traité par le BPA.

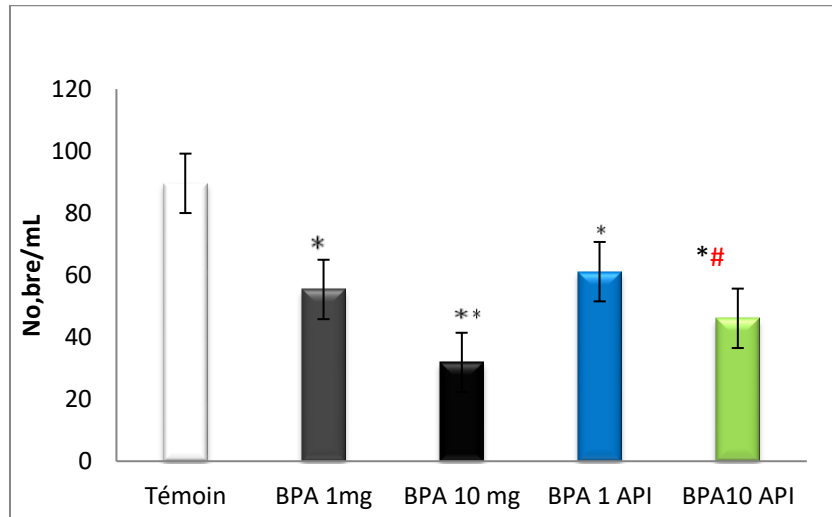
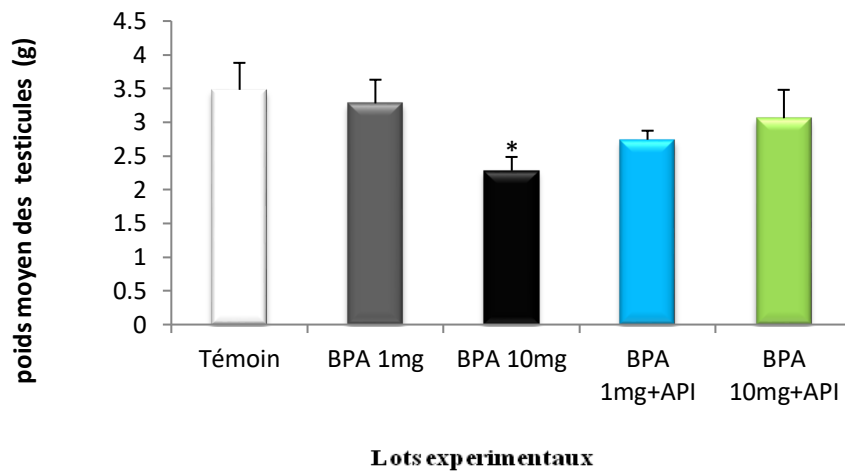
P : Seuil de signification.



**Figure 26: Etude de l'évolution du poids corporel chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement.**



**Figure 27: Variation du poids absolu (g) du foie chez les rats témoins et traités après 28 jours de traitement.**



**Figure28 :Variation du absolu (g) des testicules et concentration des spermatozoïdes chez les rats témoinset traitésaprès 28jours du traitement.**

### **II.1.3.Effet du traitement sur certains bios marqueurs plasmatiques de la fonction**

#### **hépatique**

Le tableau 08 et les figures (29,30)montrent la variation de certains biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique des rats témoins et des rats traités par le BPA et par les combinaisons BPA plus API après 28 jours du traitement.

#### **A- Concentration plasmatique en bilirubine totale**

D'après les résultats obtenus (Tabl 08 ), on observe une augmentation significative ( $P < 0,05$ ) de la concentration plasmatique en bilirubine totale chez les rats traités par le BPA à 1mg/kg et hautement significative ( $p < 0.01$ ) chez les rats traités par le BPA à 10mg/kg par rapport au témoin alors qu'une diminution est observée chez ceux traités par BPA +API 1 et 10mg/kg En effet ,cette concentration varie de 3.31et 3.48 mg/dl pour les rats traités par 1 et 10 mg/kg de BPA et 2.03 et 2.39 mg/dl pour ceux traités par 1 et 10 mg BPA+Api.

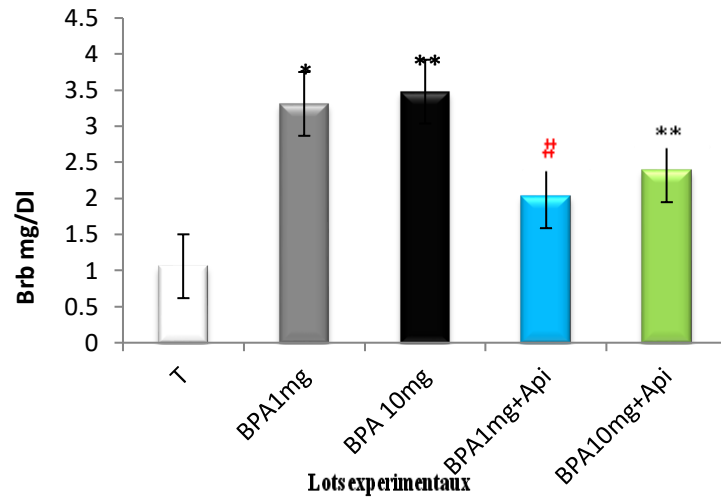
#### **B- Activités des transaminases**

Le traitement des rats par le BPA à 1mg/kg induit une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) de l'activité de l'ALAT et de l'ASAT et une augmentation hautement significative ( $P \leq 0,01$ )de l'activité des transaminases chez les rats traités par le BPA à 10mg/kg par rapport au groupe témoin. Par contre, on note un rétablissement par une diminution significative de l'activité des transaminases chez les rats traités par les combinaisons BPA +API avec une variation significative ( $p \leq 0,05$ ) par rapport aux lots traités uniquement au BPA.

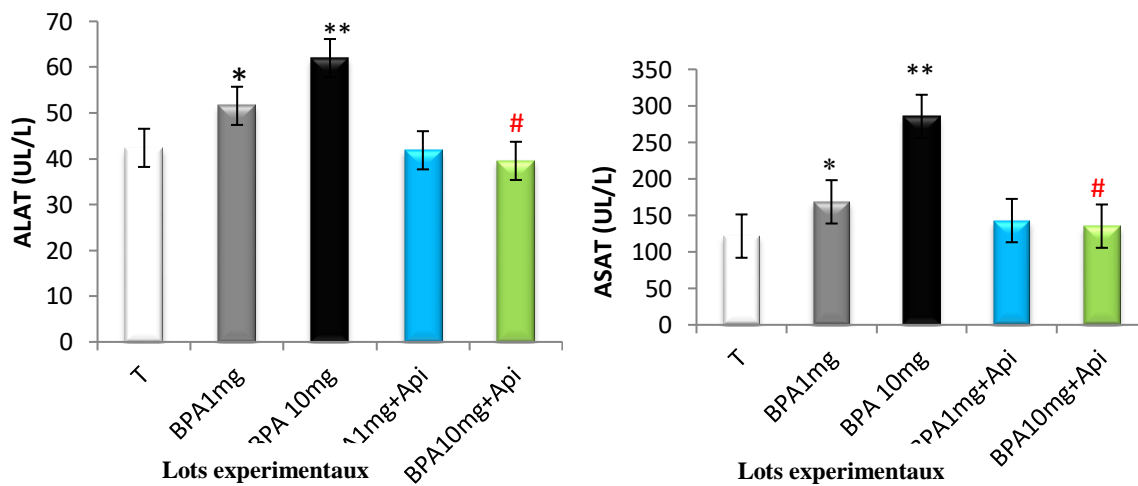
**Tableau 08: Variation de certains biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique chez les rats témoins et traités après 28jours du traitement.**

Paramètres	Lots expérimentaux				
	Témoin	BPA 1mg	BPA 10mg	BPA10mg+API	BPA 10mg+API
<b>Brb (mg/l)</b>	1.06± 0.23	3.31 ± 0.19*	3.48±0.12**	2.03±0.142 <sup>#</sup>	3.91± 0.18**
<b>ALT(U/L)</b>	42.37±2.39	51.55±3.22*	61.97±3.89**	41.84±2.87 <sup>#</sup>	39.53±3.58 <sup>#</sup>
<b>AST(U/L)</b>	121.58±3.50	168.5±3.10*	285.52±4.20**	142.85±3.3	135. 21±2.8 <sup>#</sup>

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n= 5 animaux). \*\*P <0,01 ; \*P<0,05: Différence significative comparant au groupe témoin.##P <0,01 ; #P < 0,05 : Différence significative comparant au groupe traité par le BPA. P : Seuil de signification.



**Figure29 : Variation de la concentration en Bilirubine en mg/Dl chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement.**



**Figure30: Variation de l'activité enzymatique des transaminases ASAT (UI/I) et l'ALAT (UI/I) chez les rats témoins et traités après 28 jours du traitement.**

## II.1.4.Effet du traitement sur les niveaux plasmatiques d'hormones impliqués dans régulation de la fonction reproductrice

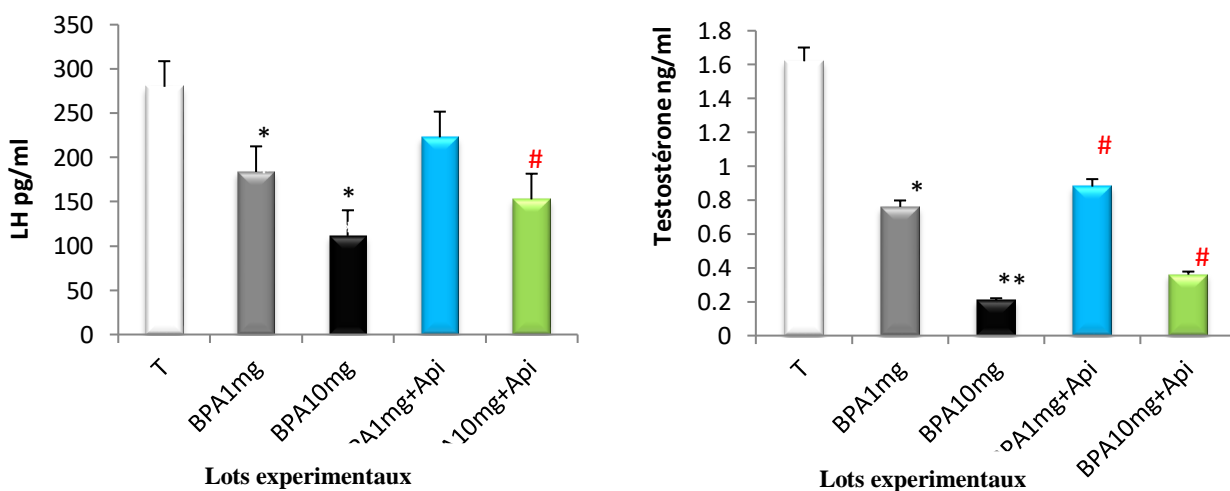
La Figure (31) illustre les résultats concernant la variation des niveaux de la LH plasmatique et la testostérone et chez les rats témoins et les rats traités après quatre semaines de traitement.

### C- Variation du taux de LH plasmatique

Nos résultats montrent que le niveau de la LH plasmatique diminue significativement chez les rats traités par les deux concentrations du BPA à 1 et 10 mg/kg, alors qu'une augmentation remarquable est observée chez ceux traités par les combinaisons BPA/API 1 et 10 mg/l. En effet, le traitement par l'Apigénine semble avoir un effet réparateur sur les niveaux de la LH. Les résultats s'accordent pour une altération de la réponse de l'axe gonadotrope. L'analyse statistique n'a pas révélé de différences significatives ( $p \leq 0,005$ ).

### D- Variation de la concentration plasmatique en testostérone

Concernant la testostérone plasmatique, nos résultats montrent une diminution significative ( $p \leq 0,005$ ) et dose dépendante chez les rats traités au BPA à raison de 1 mg/kg et une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) chez les rats traités au BPA à raison de 10 mg/kg comparativement au groupe témoin. Alors que le traitement par les combinaisons BPA/API 1 et 10 mg/l semble avoir un effet réparable sur les niveaux de testostérone plasmatique,



**Figure 31: variation du taux de la LH et de la testostérone plasmatique chez les rats témoins et traités pendant 28 jours du traitement.**

## **II.2. Effet du BPA et de la supplémentation en API sur la réponse des bios marqueurs de stress oxydatif**

### **II.2. 1. Au niveau hépatique**

#### **II.2. 1.1. Effet sur le taux du glutathion réduit(GSH)**

La Figure(.) illustre les résultats concernant la variation de taux du glutathion réduit (GSH) chez les rats témoins et les rats traités après quatre semaines de traitement. On constate une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) du taux du glutathion réduit (GSH) au niveau hépatique chez les rats traités par deux les concentrations de BPA à savoir 1 et 10 mg/kg de poids corporel pendant 28 jours comparativement au lot témoin. Cependant, la supplémentation en API semble atténuer l'effet radicalaire du BPA qui se traduit par une augmentation de la teneur en glutathion réduit hépatique. On a constaté, suite aux tests réalisés une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) chez le lot traité par la combinaison du BPA 1mg/API par rapport au lot témoin et une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) chez le lot traité par la combinaison du BPA 10mg/API par rapport aux lots traités aux BPA seul.

#### **II.2. 1.2. Activité de la glutathion S-transférase (GST)**

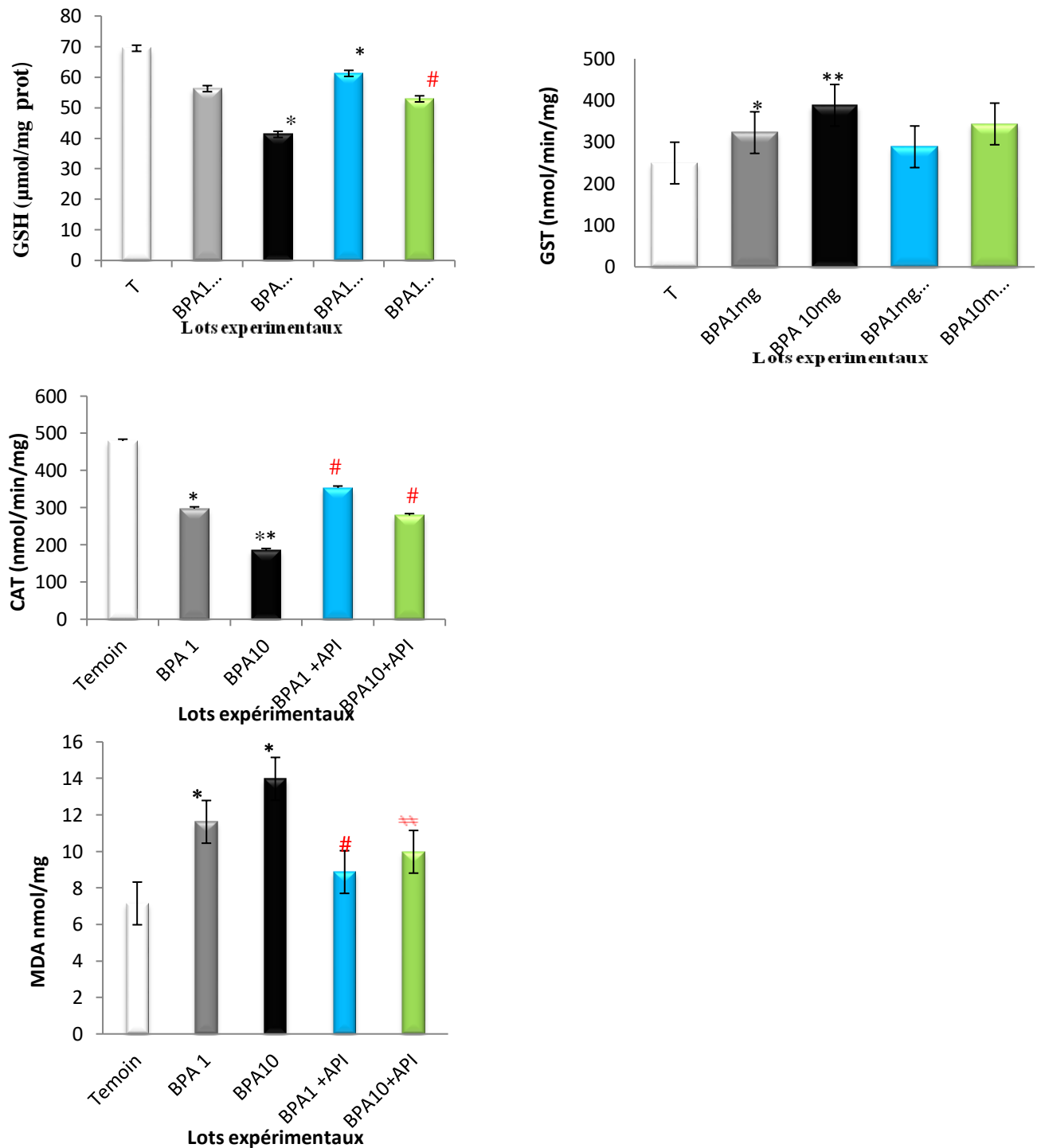
La figure (32) représente la variation de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) au niveau hépatique des rats témoins et traités par BPA à 1mg, BPA à 10mg, BPA 1/API et BPA 10mg/API après 28 jours du traitement. Les résultats de la figure (32) montrent une augmentation hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) au niveau du foie chez les rats traités au BPA à raison de 10 mg/kg et une augmentation significative ( $p \leq 0,05$ ) chez les rats recevant BPA à raison de 1 mg/kg par rapport au groupe témoin. Tandis qu'on enregistre un rétablissement par une diminution remarquables de l'activité de la GST chez les rats recevant les combinaisons BPA/Api 1 et 10 mg/kg.

#### **II.2.2.1.2. Activité de la catalase (CAT)**

Les activités de la catalase présentent une diminution chez les lots traités par le BPA. L'analyse de la variance met en évidence une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les animaux du lot témoin et ceux des lots traités par BPA. En revanche, le traitement protecteur des animaux avec API normalise clairement l'activité de cette enzyme, et on constate une variation hautement significative de leur activité par rapport au témoin (Figure 32).

### II.2.2.1.1. Taux du malondialdéhyde (MDA)

Nous avons constaté une élévation du MDA significative ( $p \leq 0.05$ ) chez les rats recevant BPA par rapport au témoin. Cependant, l'administration de l'API a diminué le taux du MDA de façon hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) chez les lots traités par BPA.



**Figure 32 : Variation de la teneur cellulaire en glutathion(GSH),de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST),de la catalase et malondialdéhydehépatique chez les rats témoins et traités pendant 28 jours du traitement.**

## **II.2. 2. Au niveau testiculaire**

### **II.2.2.1.Effet sur la teneur en glutathion réduit (GSH)et activité de la glutathion-S-transférase (GST)**

La Figure (33) représente la variation du taux de GSH au niveau des testicules des rats traités par Le BPA à 1 et 10mg/kg de poids corporel et BPA/API après quatre semaines de traitement. On a remarqué que la concentration du glutathion réduit (GSH) diminue hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) et significative ( $p \leq 0,05$ ) chez les rats traités par deux doses du BPA (10 et 1 mg/kg de poids corporel). Toutefois, les rats traités par API montrent une augmentation du taux de GSH par rapport à ceux traité par BPA1mg/API.

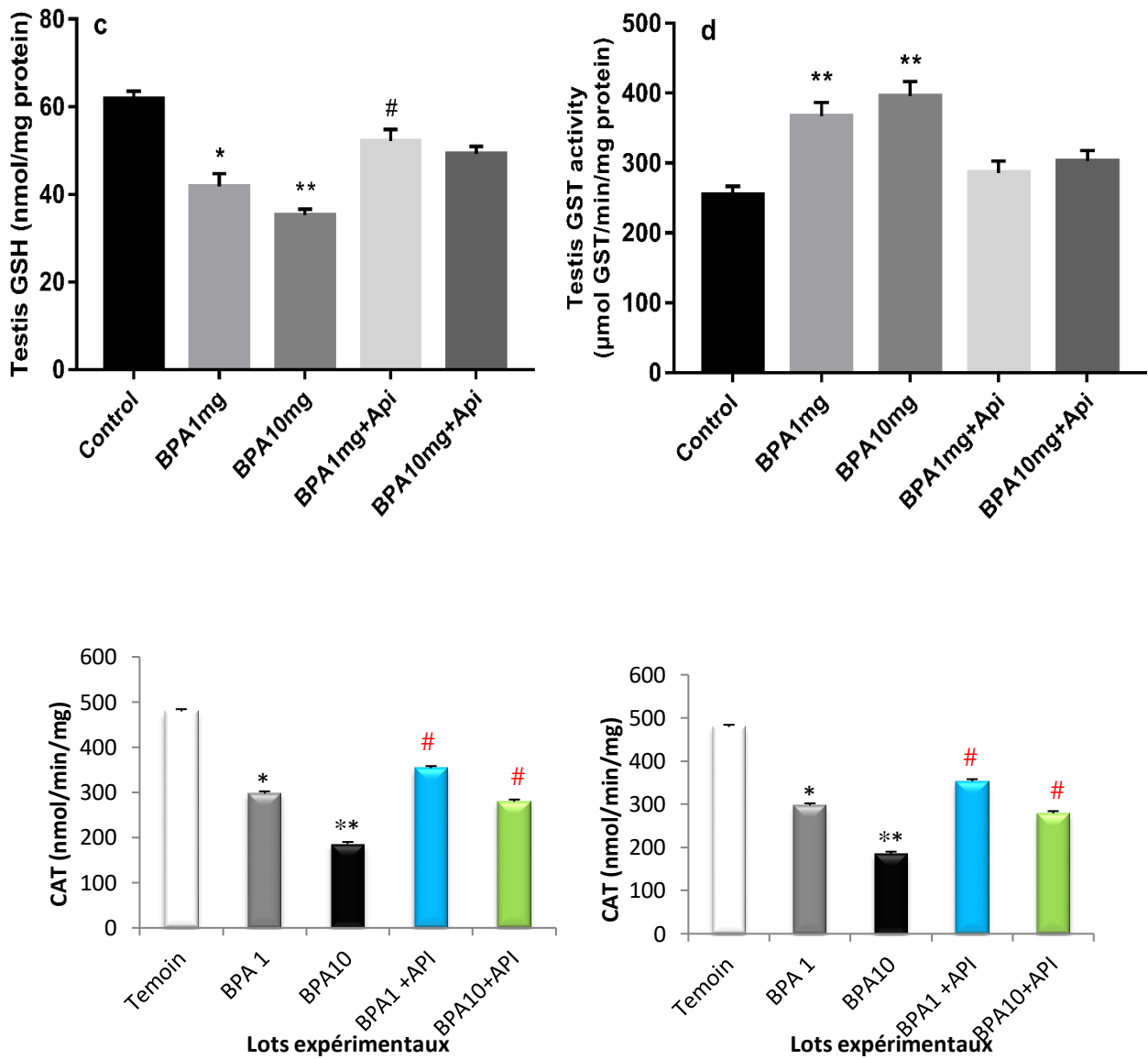
Concernant l'activité de la GST, nos résultats affichent une augmentation de l'activité de cette enzyme chez les groupe traité par le BPA cette réponse est dose dépendante ( $p \leq 0.01$  et  $p \leq 0,05$ ). Le traitement de rats par API semble avoir un effet inhibitif et a rétablie l'activité de la GST qui devient comparable à celle du témoin (Figure 33)

#### **II.2.2.1.2. Activité de la catalase (CAT)**

Les activités de la catalase présentent une diminution chez les lots traités par le BPA.L'analyse de la variance met en évidence une différence significative( $p \leq 0.05$ ) entre les animaux du lot témoin et ceux des lots traités par BPA. En revanche, le traitement protecteur des animaux avec API normalise clairement l'activité de cette enzyme, et on constate une variation hautement significative de leur activité par rapport au témoin.

#### **II.2.2.1.1. Taux du malondialdéhyde (MDA)**

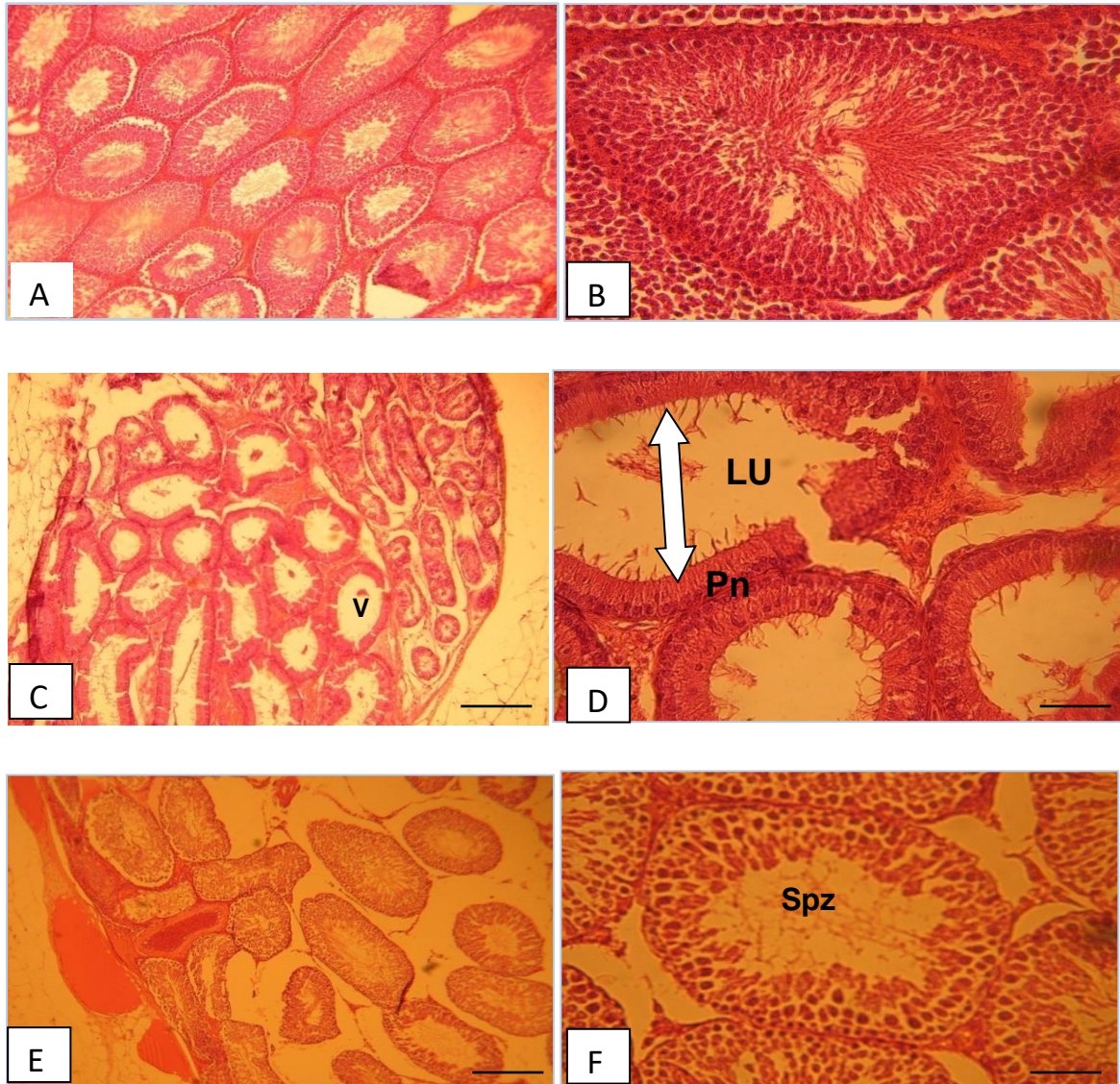
Nous avons constaté une élévation du MDA significative ( $p \leq 0.05$ ) chez les rats recevant BPA par rapport au témoin,Cependant, l'administration du l'API a diminué le taux du MDA de façon hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) chez les lots traités par BPA.



**Figure 33 :Variation de la teneur cellulaire en glutathion(GSH), de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST),de la catalase et malondialdéhydetesticulaire chez les rats témoins et traités pendant 28 jours du traitement.**

### **II.3. Effet du BPA et de la supplémentation en API sur la structure des testicules**

L'observation microscopique de l'histologie des testicules de rats témoins montre un tissu testiculaire normal constitué d'une structure normale du tube séminifère (Ts) avec spz sperme concentré dans la lumière (Lu) a, d cellule de leydig normale (Cl) dans le tissu interstitiel (TI) et aucune modification dans un épithélium séminifère stratifié (Es) (figure ... A et B).Cependant, dans les groupes de traitement au BPA, a révélé des altérations sévères de l'épithélium séminifère stratifié avec réduction de sa densité et avec des cellules germinales rares à noyaux pycnotiques (Np), l'absence de cellules de leydig est pratiquement absente dans l'esprit et une diminution significative du nombre de spermatozoïdes(Figure .. C, D).(V): vacuolisation.Cependant, l'observation microscopique de coupes de testicules de rats recevant le traitement combiné (BPA + API) a montré moins d'altérations histologiques dans l'épithélium séminifère stratifié par rapport aux seuls rats traités au BPA, et par conséquent, l'intensité des lésions tissulaires testiculaires a été nettement réduite.

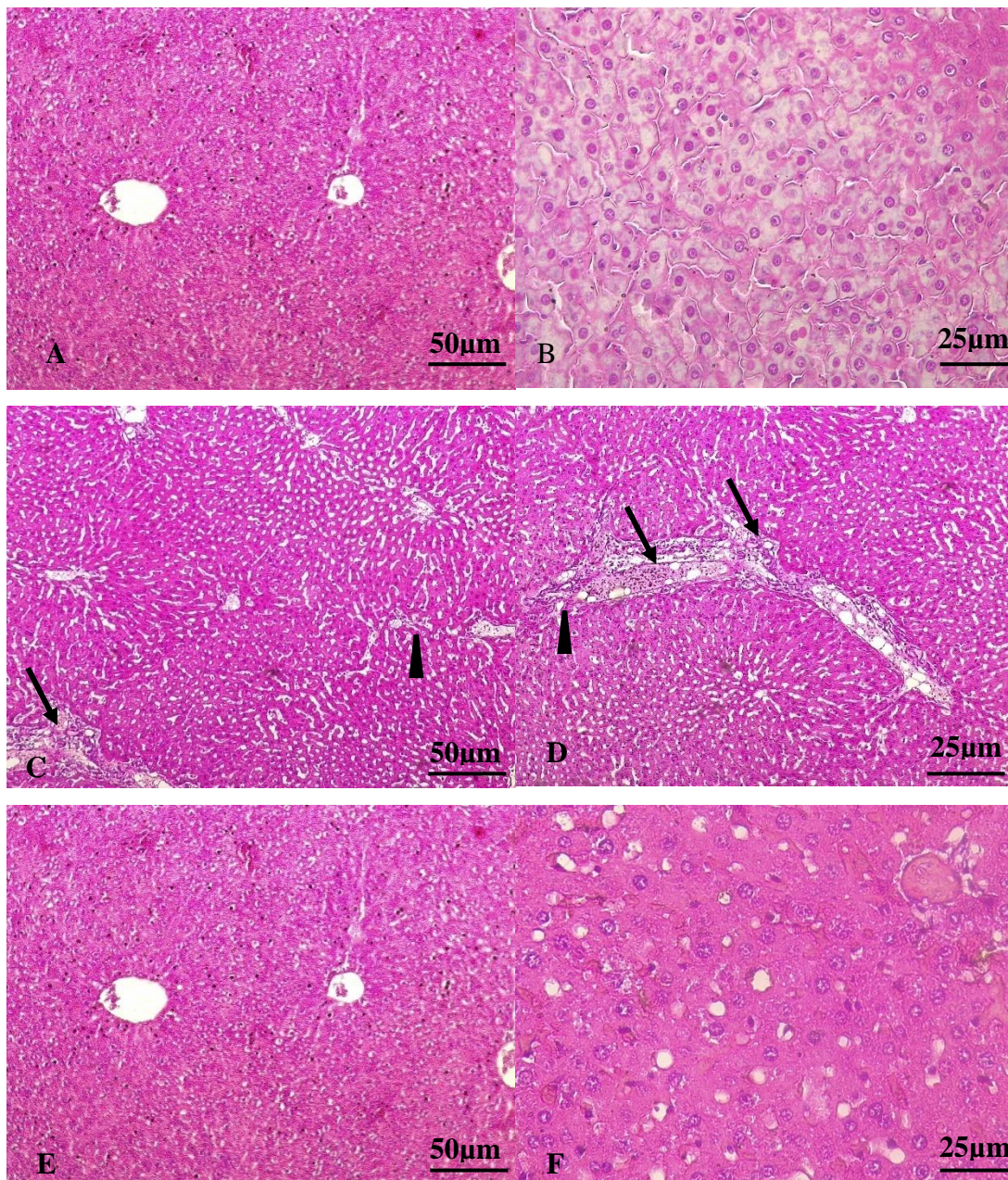


**Figure 34 : Coupes histologiques des testicules chez le rat;témoin (A, B) BPA (C, D) et BPA-API traités (E, F) colorés à l'hématoxyline-éosine.**

A et B montrent une structure normale du tubule séminifère (St), des spermatozoïdes Spz concentrés en lumière (Lu), des cellules de Leydig (LC) dans le tissu interstitiel (TI) et de l'épithélium séminifère stratifié (Es).Ce dernier est moins dense et possède des cellules germinales rares avec des noyaux pycnotiques (Np), les cellules de Leydig sont pratiquement absentes chez les rats BPA (C, D).(V): vacuolisation.Restauration d'Es dans traité avec API (E, F). Les coupes ont été observées à un grossissement de 150 et 600 fois (barres d'échelle: 50  $\mu$ m).

#### **II.4. Effet du BPA et de la supplémentation en API sur la structure du foie**

Des altérations morphologiques susceptibles d'être attribuées au traitement par le BPA ont été observées dans le tissu hépatique. Les modifications histopathologiques du foie de rat résultant du traitement par BPA sont illustrées dans la figure N°34(C et D). Les rats témoins présentaient une morphologie hépatique normale avec des hépatocytes distincts aux noyaux proéminents et aucune lésion tissulaire (Fig.N°35.A et B). En revanche, les coupes de foie des rats traités au BPA (Figure N° C et D) présentaient des lésions structurelles caractérisées par l'infiltration de cellules mononucléaires, l'expansion périportale, le ballonnement et la dégénérescence des hépatocytes. Le Traitement des rats par API semble restaurer ces altérations (Figure N°35E et F)



**Figure 35 :**Photomicrographie de coupes H&E de foie de rats témoins (A et B) montrant des cellules hépatiques normales avec des noyaux et un cytoplasme bien définis (Hc), une veine hépatique normale (double flèche) (barre d'échelle 50 et 25  $\mu$ m). C et D Section du foie de rats traités par le BPA, montrant des altérations dégénératives avec des hépatocytes anucléaires et une infiltration de lymphocytes et de cellules de Kupffer (flèches noires), une congestion et la présence d'une zone nécrotique ( ). E et F section du foie de rat BPA + API montrant une amélioration au niveau du tissu hépatique avec une nette diminution de l'inflammation (barre d'échelle 50  $\mu$ m barre d'échelle 25  $\mu$ m).

### III. Discussion

Le bisphénol A (BPA : 4 dihydroxy-2,2-diphénylpropane) fait partie des produits chimiques qui sont produits en grandes quantités. Il est couramment utilisé comme plastifiant et intermédiaire dans la synthèse des résines époxy, des plastiques polycarbonates [Huang et al 2012] ainsi que comme additif pour l'élimination de l'excédent d'acide chlorhydrique d'acide chlorhydrique lors de la fabrication du polychlorure de vinyle (PVC). Il est important de signaler, aussi que le BPA est largement utilisé dans la production d'équipements de santé [Vandentorren et al. 2011], de composites dentaires [Drozd et al. 2011], de lentilles de contact, de verres de lunettes, de jouets, de supports de stockage et d'autres matériaux, lentilles de contact, des verres de lunettes, des jouets, des supports de stockage et des films pour fenêtres par ce qui signifie qu'il est en contact direct avec l'organisme [Arnold et al., 2013]. On estime qu'en 2008, la production mondiale totale de BPA était d'environ 5,2 millions de tonnes [Arnold et al., 2013]. En raison de sa production de masse, un grand nombre de dérivés du BPA sont libérés dans l'environnement, ce qui entraîne une augmentation de la pollution et de la contamination du sol et des eaux souterraines (Genuis et al., 2012). Le bisphénol A est répandu de manière ubiquitaire dans notre environnement, largement utilisé dans la fabrication des plastiques avec l'un des plus grands volumes de production à l'échelle mondiale. Il est un perturbateur endocrinien par excellence de type œstrogène-mimétique.

Plusieurs études ont rapporté que le BPA affecte défavorablement beaucoup d'organes particulièrement le foie et les testicules par l'induction de l'état d'oxydation. La présente étude a pu mettre l'accent sur l'effet protecteur d'une supplémentation d'un flavonoïde « Apigénine » à raison de 20 mg/kg du poids corporel vis-à-vis la toxicité et l'état de stress oxydatif induit par le BPA à des doses de 1 et 10 mg/kg chez les rats Wistar.

Il a été rapporté dans un ensemble de travaux que la réduction du poids corporel est utilisée comme indicateur de la détérioration de l'état de santé générale du rat. En outre, la perte d'appétit est souvent synonyme de perturbations du métabolisme des glucides, protéines ou lipides (Yuet et al., 2013). Dans nos conditions expérimentales, l'administration du BPA à des doses de 1 et 10 mg/kg de poids corporel chez les rats a provoqué une diminution de poids corporel par rapport au lot témoin. Ceci pourrait être expliqué par la diminution des prises quotidiennes en aliment (données non documentées).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Hassan et al., 2012 ; Gurmeet et al., 2014 qui ont montré une diminution significative du poids corporel des rats exposés au BPA à des

doses de ( 1, 5 et 100 mg/kg) par rapport au groupe témoin. En général, la chute corporelle est due en premier à une diminution de la masse grasse suivie de celle de la masse maigre. Elle représente la conséquence ultime d'un déséquilibre de la balance énergétique entre les apports qui sont inférieurs aux dépenses énergétiques (Ritz et al., 2007).

Contrairement à nos résultats, Rubin et al.,2001 ont trouvé l'augmentation significative du poids corporel de la progéniture femelle de rats de SpragueDawley exposée à de faibles doses de BPA.Chez des femelles Sprague-Dawley adultes, ovariectomisés une exposition au BPA à des doses de 4 mg/j ou 5 mg/j via des mini pompes implantées au niveau dorsal pendant 15 j montre une diminution de gain de poids, avec une accumulation préférentielle au niveau du tissu adipeux brun (Nunez et al 2001).

Malgré les effets du BPA sur la balance énergétique, les mécanismes restent encore peu élucidés. Xu et al, 2011 montrent une variation dans la préférence au sucré (saccharine et sucrose) après une exposition in utero à des faibles doses de BPA (0,1 mg/kg PC/j, 1 mg/kg PC/j). Cette augmentation de consommation de sucré signifie une augmentation de prise d'énergie qui se traduit par une augmentation de poids corporel (Xu et al 2011a). Des interactions au niveau du système neuroendocrinien qui contrôle la balance énergétique d'une part et d'autre part la reproduction peuvent être la cible de perturbateur endocrinien, ce qui peut expliquer ces effets (Bourguignon et al 2010).

Dans nos conditions expérimentales, l'addition d'API à raison de 20 mg/kgaux rats traités par le BPA a engendré une élévation de poids corporel. Ceci pourrait être due à la réduction de l'accumulation des radicaux libres induite par les antioxydants et confirmé par l'augmentation de la consommation quotidienne de nourriture. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Al-Shinnawy (2008), Ismail et al. (2009), Sankar et al. (2010), Messarah et al. (2012) et Mossa et al. (2014), qui ont utilisé d'autre antioxydants.

Dans les études de toxicologie, l'estimation du poids des organes est un bon indicateur dans l'évaluation des effets nocifs des xénobiotiques (Bailey et al. 2004, Sellers et al 2007).

Concernant le poids des organes, nous remarquons une diminution de poids relatif de foie et des testicules chez les rats traités par BPA. Ceci est explicable par le fait que le BPA pourrait agir sur les hormones régulant le métabolisme et principalement ceux qui contrôlent le comportement alimentaire. Cette constatation est appuyée par les résultats rapportés par Hassan et al. (2012) et ceux de Gurme et al.(2014) qui ont montré une diminution significative du poids corporel des rats exposés à 1, 5 et 100 mg/kg de BW de BPA par rapport au groupe témoin. D'autre part, certains rapports dans les littératures étaient

incompatibles avec nos résultats, où Rubin et al.(2001) ont trouvé l'augmentation significative du poids corporel de la progéniture femelle de rats de Sprague-Dawley exposée à de faibles doses de BPA. Il a été rapporté dans un ensemble de travaux que la réduction du poids corporel serait un indicateur de la détérioration de l'état de santé général des rats. En outre la perte d'appétit est souvent synonyme à des perturbations en métabolisme des glucides, protéines ou lipides (Yuet et al., 2013). Chez des femelles Sprague-Dawley adultes, ovariectomisés une exposition au BPA à des doses de 4 mg/j ou 5 mg/j via des mini pompes implantées au niveau dorsal pendant 15 j montre une diminution de gain de poids, avec une accumulation préférentielle au niveau du tissu adipeux brun (Nunez et al 2001). Malgré les effets du BPA sur la balance énergétique, les mécanismes restent encore peu élucidés. Xu et al, 2011 montrent une variation dans la préférence au sucré (saccharine et sucrose) après une exposition in utero à des faibles doses de BPA (0,1 mg/kg PC/j, 1 mg/kg PC/j). Cette augmentation de consommation de sucré signifie une augmentation de prise d'énergie qui se traduit par une augmentation de poids corporel (Xu et al 2011a). Des interactions au niveau du système neuroendocrinien qui contrôle la balance énergétique d'une part et d'autre part la reproduction peuvent être la cible de perturbateur endocrinien, ce qui peut expliquer ces effets (Bourguignon et al 2010).

En revanche, nos résultats indiquent que l'administration d'API au groupe traité par BPA a entraîné une amélioration des poids absolu des organes (foie et testicules). Cette amélioration est due à l'effet protecteur de l'API contre la toxicité induite par le BPA à une dose de 1 et 10mg/ kg chez les rats Wistar.

Le foie, principal organe de métabolisme, d'excrétion intervenant dans la détoxification des xénobiotiques (Rjeibi et al.,2016), doté d'un accès immédiat aux substances toxiques provenant du tube digestif à travers la veine porte, il exerce une action chimique et enzymatique sur ces agents (LeCluyse et al., 2012). Lors d'insuffisance hépatique, ces substances indésirables ont tendance à s'accumuler dans le corps et entraînent potentiellement des toxicités.

De plus, les enzymes sériques, notamment l'ALP, l'ALAT, l'ASAT et la LDH, sont les biomarqueurs les plus sensibles utilisés pour déterminer le dysfonctionnement hépatique et les lésions hépatotoxiques (Heikal et al., 2013 ; Uzun et Kalender, 2013 ; Moser et al., 2015). Dans notre étude, L'administration du BPA a raison de 1 et 10 mg/Kg pendant 30 jour chez les rats a provoqué une élévation marquée dans des activités sériques du l'AST et l'ALT .Nos résultats sont en accord avec les travaux de Yamaski et al.(2001); Korkmaz et al. (2010), Mourad &Khadrawy (2012) et Abdel-Rahman (2018).

En outre, le niveau de l'ALAT plasmatique est également utile en indiquant l'existence des affections hépatiques, car cette enzyme est présente en grande quantité dans le foie. Il augmente dans le plasma quand la dégénération ou la destruction cellulaire se produit dans cet organe (Hassoun et Stohs, 1995). L'augmentation du taux d'ASAT est virtuellement responsable de tous les types de maladies hépatiques. Sa concentration maximale et son rapport aux autres enzymes reflètent le type de lésion hépatique. Il est bien connu que l'ASAT est une enzyme très spécifique pour le tissu hépatique. Il est plus sensible aux dommages hépatiques et son niveau augmente plus vite et plus haut dans la plupart des types de dommages cellulaires hépatiques (Tivari et Srivastava, 2001). Ces résultats reflètent le changement de la perméabilité membranaire des hépatocytes (Eissa et Zidan, 2010 ; Raina et al., 2015) qui permet la sortie de ces enzymes du cytoplasme dans la circulation sanguine indiquant une nécrose et des réactions inflammatoires (Navarro et al., 1993 ; Acker et al. 2012 ; El-Demerdash et al., 2012 ; Heikal et al., 2013 ; Tanvir et al. 2015). Donc ils ont causé des dommages hépatiques sévères (Oluah, 1998, 1999 ; Rao, 2006). Plusieurs études indiquent l'effet hépatoprotecteur de l'API contre les produits chimiques. Dans notre travail, l'administration d'API à raison de 20 mg/kg semble avoir un effet protecteur vis-à-vis la toxicité du BPA au niveau hépatique, ceci est révélé par un rétablissement des concentrations des marqueurs enzymatiques sériques, les transaminases, Ceci est en accord avec les résultats de plusieurs études antérieures qui ont investi l'effet hépato-protecteurs d'API.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Yang, J et al., 2013 qui ont observé après administration orale d'API à des doses de 100 et 200 mg/kg pendant 7 jours. une diminution du taux sériques d'alanine aminotransférase et d'aspartate aminotransférase progressivement et la gravité des lésions hépatiques a diminué sur les lésions hépatiques aiguës chez la souris induites par l'acétaminophène. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Tsaroucha et al. (2016) et Raskovic et al. (2015), ce qui explique que le traitement de la dose toxique de paracétamol ainsi que l'APG ont considérablement réduit la concentration sérique des enzymes ALP, ALT et AST.

Les contaminants environnementaux affectent les fonctions normales des systèmes endocriniens et reproducteurs soit en imitant ou en inhibant les hormones endogènes, soit en modulant la synthèse des hormones (Sonnenschein et Soto, 1998). Comme perturbateur endocrinien, les effets du BPA sur le système reproducteur humain, incluant des effets sur

la sécrétion hormonale, sont susceptibles d'affecter la sécrétion d'hormones telles l'oestrogène, la testostérone, l'hormone Lutéinisante (LH).

L'hormone Lutéinisante (LH) et testostérone sont des hormones essentielles pour la spermatogénèse. L'hormone LH est sécrétée de la glande pituitaire et déclenche la production de testostérone. D'autre part, il y a un besoin pour la testostérone pour produire et maintenir le sperme (Mantovani, 2002).

Plusieurs études animales in vivo du BPA ont démontré des anomalies et des toxicités à des doses à l'ordre de microgrammes ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou du nanogrammes ( $\text{ng}/\text{kg}$ ), sur la fonction de reproduction provoquant une réponse dans l'expression des gènes en se liant aux récepteurs nucléaires des œstrogènes (Richter et al., 2007).

Gurmeet et al. (2014) ont démontré que l'administration de BPA par gavage pendant une période de 6 semaines chez les rats Sprague-Dawley (SD) prépubertaires mâles ( $n = 8$  dans chaque groupe) à des doses de 1, 5, 10 et 100 mg / kg BW (poids corporel) induit des effets importants sur le développement des organes reproducteurs et des taux plasmatiques d'hormones sexuelles chez le rat adulte. Ainsi, après 6 semaines d'exposition, les rats recevant le BPA versus ceux recevant la solution contrôle (un véhicule à base de Tween) ont montré une réduction significative de la spermatogénèse. Celle-ci était liée à des dommages des tissus épithéliaux séminifères qui incluaient la rupture des jonctions intercellulaires et la destruction des cellules germinales. En outre, la lumina des tubules séminifères et l'épididyme de ces animaux étaient obstrués de cellules germinales immatures et de débris cellulaires. Ces dommages ont entraîné une réduction significative du diamètre tubulaire séminifère chez les animaux traités. Ces résultats sont associés à la baisse significative des taux plasmatiques de testostérone en l'absence de différences significatives du gain de poids corporel, du poids total et relatif des testicules ou du poids de l'épididyme des animaux traités par BPA par rapport aux animaux témoins. Les résultats supportent ainsi certains effets physiologiques néfastes du BPA sur le système reproducteur masculin (Gurmeet et al., 2014).

Certains auteurs ont rapporté que l'exposition périnatale des souris mères au BPA (0.5 à 10 mg/kg/j) entraînait, chez la descendance femelle, une puberté précoce, un changement des cycles œstraux, une chute des niveaux plasmatiques de l'hormone gonadotrope lutéinisante (LH), des lésions au niveau de l'utérus et des ovaires et une altération du développement des glandes mammaires (Nikaido et al., 2004; Zhang et al., 2011) Les résultats de la présente étude suggèrent que l'exposition à 1 mg/kg/jours pendant

30 jours du BPA par voie orale favorisé la toxicité de la reproduction mâle chez les rats adultes. Une diminution significative des niveaux de plasma LH et parallèlement une baisse du taux de testostérone plasmatique totale dans les groupes traités par BPA.

Ces résultats sont en accord avec ceux des études précédentes, dans lesquelles le BPA a causé un changement dans l'axe hypothalamique-pituitaire-gonadal en diminuant le fonctionnement de la cellule de Sertoli (Jin et al., 2013).

Selon Akingbemi et al. (2004), le BPA a un effet sur l'hypophyse et perturbe l'activité testiculaire, réduisant ainsi la libération de LH. Le BPA a également été rapporté pour réduire la production de testostérone des cellules de Leydig en réduisant l'activité de 17 $\alpha$ -hydroxylase ou en augmentant l'activité d'aromatase (Kim et autres, 2010). Cependant, l'administration d'API a amélioré ces résultats. L'effet protecteur de l'APG sur le système reproducteur masculin a été signalé (Yousaf et coll., 2016).

Des données issues d'expérimentations animales montrent que l'exposition au BPA peut également être à l'origine d'une puberté précoce. L'exposition prénatale de rats à des concentrations de BPA de 2 mg/kg de poids corporel par jour accélère la puberté par rapport au groupe témoin (Honma et al., 2002). Il semble que le principal de la puberté précoce due à l'exposition au BPA est dû à son faible pouvoir oestrogénique. est dû à sa faible activité oestrogénique qui, par le biais d'un mécanisme de rétroaction positive stimule l'activité du générateur d'impulsions GnRH du générateur d'impulsions GnRH, ce qui entraîne une augmentation de la LH et de la FSH dans l'hypophyse. la sécrétion de LH et de FSH dans l'hypophyse (Ozaki et 2004). Certains rapports font état d'un rôle potentiel du BPA dans la pathogenèse du cancer du sein. pathogénie du cancer du sein. Des études menées in vitro ont montré que l'exposition au BPA d'une lignée cellulaire humaine de cancer du sein au BPA augmentait sa prolifération et provoquait un stress oxydatif accru prolifération et provoquait une augmentation du stress oxydatif (Wetherillett al., 2007) Des résultats similaires ont été obtenus pour les cellules MCF-7 à récepteurs d'oestrogènes positifs (ER +), où de faibles niveaux de BPA ont significativement sa prolifération et l'expression des récepteurs de la récepteurs de la progestérone (Krishnan et al., 1993). Des concentrations sériques élevées de BPA chez les femmes ménopausées sont également en corrélation avec la densité mammographique du tissu mammaire, la densité mammographique du tissu mammaire (Spargue et al, 2013). Il est également suggéré que l'exposition professionnelle au BPA augmente l'incidence du cancer du sein (De Metteo et al. 2012).

Le BPA pourrait être l'un des facteurs contribuant au développement du cancer de la prostate. Les études menées chez des hommes atteints de cancer de la prostate ont montré une concentration de BPA beaucoup plus élevée dans l'urine de ces patients par rapport au groupe témoin (Trapore et al. 2014). Des études in vitro ont montré que le BPA induit la prolifération des cellules cancéreuses humaines sensibles aux androgènes (Wetherill et. 2007). Chez les rats traités au BPA, une augmentation du poids de la prostate et de l'épididyme a également été observée. de la prostate et de l'épididyme (Gupta, 2000). En outre, l'exposition au BPA in utero a contribué à l'hypertrophie de la prostate chez les descendants mâles (Negel et al., 1997). L'obésité est un trouble métabolique sur lequel le BPA a également un impact. Des études animales ont montré une corrélation entre l'exposition prénatale à des perturbateurs endocriniens, dont le BPA, et la prévalence de l'obésité, de l'insuffisance prévalence de l'obésité, de l'altération de la tolérance au glucose et du métabolisme lipidique chez la souris. métabolisme lipidique chez les souris (Newbold et al., 2009).

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la quantité de production de radicaux libres et la présence d'antioxydants. Les cellules ont divers mécanismes de défense contre le stress oxydatif, y compris les charognards enzymatiques tels que GSH, SOD, CAT et TPS qui protègent le système contre les effets délétères de ROS. Le glutathion fournit une première ligne de défense contre ROS, tout comme peut récupérer les radicaux libres et réduire H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Cette étude a révélé une diminution significative des niveaux de GSH chez les rats traités au BPA. Ces résultats étaient conformes à ceux enregistrés par Wu et al. 2011 ; Hassan et al.,(2012) et Abdel-Wahab et al., (2014). Cela pourrait s'expliquer par l'augmentation de la consommation de GSH dans le piégeage des ROS généré par le BPA. La réduction de GSH montre l'échec du système antioxydant primaire à agir contre les radicaux libres.

La diminution du GSH peut entraîner une altération des mécanismes de détoxification métabolique (Verma et al., 2007), car le rôle du GSH dans la détoxification a été démontré dans de nombreuses études (Lu, 1999 ; Rouabhi et Bazouzi, 2012). Cet antioxydant joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie redox cellulaire (Shi et al., 2004). Bien que les mitochondries produisent des ROS continues pendant la phosphorylation oxydative, les fuites de superoxyde dans la chaîne de transport d'électrons sont examinées par la superoxyde dismutase mitochondriale et cytoplasmique (SOD) et les peroxydases en réduisant le taux de GSH (Gasmi et al., 2016)

Les glutathion S-transférases (GST) représentent un groupe majeur d'enzymes de détoxification (Hayes et Pulfordet, 1995) et/ou dans la protection contre les métabolites nocifs générés par la dégradation des macromolécules en raison de leur exposition au stress oxydatif (Che-Mendoza et al., 2009 ; Rouabhi et al., 2015). Sur la base de nos observations, nous avons observé une diminution significative de l'activité de la GST cytosolique et dans les mitochondries hépatiques des rats traités au BPA à deux doses (1 et 10 mg/kg) .

Le GSH protège les cellules contre un stress oxydatif généré par les produits chimiques environnementaux tels que le BPA (Che-Mendoza et al., 2009). Il catalyse la conjugaison de divers substrats électrophiles du groupe thiol du GSH, produisant des formes moins toxiques (Mansour et Mossa, 2009). La diminution de l'activité de GST observée dans la présente étude pourrait de loin contribuer à la peroxydation lipidique augmentée, représentée par les niveaux accrus du MDA (Zaidi et Banu, 2004). En outre, cette diminution reflète l'insuffisance des niveaux de GSH (Garg et al., 2008 ; 2009).

Raza et al. (2002) ont montré que la GST purifiée à partir des mitochondries hépatiques de souris peut jouer un rôle important dans la défense contre le stress chimique et oxydatif, et le maintien d'un état redox mitochondrial favorable durant le métabolisme cellulaire. Hubatsch et al. (1998) ont démontré que la GST joue un rôle protecteur important, et que des variations dans son expression peuvent avoir des conséquences physiopathologiques importantes.

Dans cette étude, on a remarqué une forte augmentation des niveaux de TPS chez les rats traités par BPA. Ce résultat est en ligne avec ceux obtenus par Heba et al. (2015). Une diminution de la GSH et une augmentation des niveaux de GST des rats en raison du BPA ont été rétablies sous l'effet de l'API. Ceci peut avoir le potentiel antioxydant de l'API. À cet égard, des études antérieures ont rapporté que l'API ont des propriétés antioxydantes contre les dommages oxydants hépatiques induits par des produits chimiques agissant probablement comme charognards des espèces réactives d'oxygène (ROS) (Ali et al., 2014).

Selon les résultats histologiques, chez les rats traités par BPA ont montré une atrophie testiculaire et la vacuolisation des tubes séminifères. Le lumen des tubes séminifères contenait très peu de sperme. Les changements ainsi observés reflètent le début de l'arrêt de la spermatogenèse. Le début de l'arrêt de la spermatogenèse se reflète par une réduction du nombre de cellules de Leydig chez les rats BPA traités. Le BPA semble avoir un effet direct sur ces cellules de Leydig et limite la synthèse des hormones stéroïdes (Marghani et coll., 2018, John et coll., 2019).

L'hypotrophie du tissu endocrinien observée chez les rats traités au BPA aurait un impact sur le fonctionnement des cellules annexées et endocriniennes, comme la cellule de Sertoli produisant de l'inhibine et de l'ABP (Salian et al., 2009). On pense que tous les changements structuraux et biochimiques dans les testicules et les organes connexes sont secondaires aux troubles hormonaux tels que la baisse des niveaux plasmatiques de FSH et de LH observée chez les mammifères contaminés par des perturbateurs endocriniens (Akingbemi et al., 2004). L'analyse des paramètres histomorphométriques des testicules a révélé une augmentation des altérations chez les rats traités au BPA (hypoplasie testiculaire significative dans ce dernier par rapport aux témoins, associée à une diminution du nombre de tubes séminifères chez les rats traités au BPA par rapport à ceux traités par API) (Munir et al., 2017). Ces changements sont corrélés avec une baisse du niveau de protéines testiculaires et épидидymales et une diminution du nombre de spermatozoa chez les rats BPA. L'albumine, les protéines de transport hormonal (Sex-HormonBinding Globulin ou SHBG), les facteurs de croissance (facteur de croissance de l'insuline ou IGF) et les enzymes sont des facteurs essentiels dans la régulation de la fonction reproductrice (Drewes et coll., 2003). Considérant la participation des protéines dans la synthèse des facteurs et des enzymes contrôlant la fonction de reproduction, leur diminution pourrait justifier l'altération de spermatogenèse observée dans le BPA traité. Vawda et Mandlwana (1990) ont suggéré qu'une carence en protéines peut affecter le nombre de spermatozoïdes et la mobilité. Ce désordre de métabolisme de protéine peut également inhiber la sécrétion du GnRH hypothalamique et la production du LH pituitaire et de FSH modifiant la stéroïdogenèse et la spermatogenèse (Kumar et autres, 2009). Néanmoins, la co-administration d'API a atténué les perturbations testiculaires induites par le BPA via l'amélioration marquée des niveaux de LH et d'hormones testeurs. Ces résultats réaffirment les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de l'API démontrées par plusieurs études (Singh et autres, 2004 ; Rithidech et coll., 2012).

# Conclusion

---

## Conclusion

L'objectif de ce travail était d'explorer deux fonctions vitales hépatique et testiculaire susceptibles d'être affectées par un perturbateur endocrinien le BPA chez le rat et de tester l'effet cyto-protecteur antioxydant d'un flavonoïde l'apéginine.

Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

### - L'administration de BPA chez les rats, a engendré :

- ❖ Des perturbations au niveau de la croissance générale des rats :
  - ✓ Diminution du poids corporel durant la période de traitement
- ❖ Des perturbations au niveau de certains paramètres métaboliques biomarqueurs de l'activité hépatique :
  - ✓ Augmentation des concentrations plasmatiques en bilirubine de l'endommagement du foie.
  - ✓ Augmentation de l'activité enzymatique des transaminases (ASAT et ALAT).
- ❖ L'exposition continue au BPA génère un état de stress oxydant traduit par des perturbations au niveau de certains paramètres biomarqueurs
  - ✓ une perturbation des activités de quelques antioxydants enzymatiques telles que la GST et des antioxydants non enzymatiques tels que la GSH et de MDA.

D'autre part le dosage immuno-enzymatique révèle une perturbation de l'axe gonadotrope caractérisé par une diminution significative des concentrations des niveaux de la LH et la testostérone plasmatique chez les individus traités par rapport aux témoins.

Ces perturbations humorales sont appuyées par les altérations histologiques des testicules chez les rats traités au BPA.

### La supplémentation en Apéginine chez des rats traités au BpA a provoqué :

- ✓ Une correction des taux plasmatiques en bilirubine
- ✓ Une réduction de l'activité des biomarqueurs( ASAT, ALAT)
- ✓ Une amélioration du statut enzymatique antioxydant telles que la GSTet non enzymatique telle que la GSH au niveau hépatique.

Ainsi, des supplémentations en Apéginine permettent de limiter les perturbations provoquées par le BPA. Ces supplémentations semblent avoir des effets bénéfiques, par une limitation des phénomènes radicalaires et une réparation des dommages oxydantes, ceci est expliqué par leur pouvoir antioxydant qui conduit donc à contracter l'état du stress oxydant

**Référence bibliographique**

## Référence bibliographique

---

### A

---

- Abdallah, A.A.M., Nasr El-Deen, N.A.M., Abd El-Aziz, H.I. et al. (2020b) Effect of the aqueous root extract of *Curcuma longa* L. (turmeric) against thermally oxidized oil-induced hematological, biochemical and histopathological alterations. *CompClinPathol.* **29**,837–845. <https://doi.org/10.1007/s00580-020-03108-w>
- Abdallah, A.A.M., Nasr El-Deen, N.A.M., Neamat-Allah, A.N.F. et al. (2020a) Evaluation of the hematoprotective and hepato-renal protective effects of *Thymus vulgaris* aqueous extract on thermally oxidized oil-induced hematotoxicity and hepato-renal toxicity. *CompClinPathol.* **129**,451–461. <https://doi.org/10.1007/s00580-019-03078-8>
- Abdel-Rahman, H.G., Abdelrazek, H.M.A., Zeidan, D.W., Mohamed, R.M., Abdelazim, A.M. (2018). Lycopene: Hepatoprotective and antioxidant effects toward bisphenol A-induced toxicity in female Wistar rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*. PMID:5167524
- Abdel-Wahab, W.M. (2014). Thymoquinone attenuates toxicity and oxidative stress induced by bisphenol A in liver of male rats. *Pakistan journal of biological sciences*. **17**(11),1152-1160.
- Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R., Hardy, M.P. (2004) Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*. **145**(2),592-603.
- Ali, F., Naz, F., Jyoti, S., Siddique, Y.H. (2014). Protective effect of apigenin against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in albino rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **767**,13-20.
- Almasiova, V., Holovska, K., Tarabova, L., Cigankova V., Lukacinova, A., Nistiar, F. (2012). Structural and ultrastructural study of the rabbit testes exposed to carbamate insecticide. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. **47**,1319-1328.
- Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., Nadal, A. (2010). Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect.* **118**(9),1243–50.
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M., Skinner, M.K. (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*. **308**: 1466-9.
- Arora A., Sairam R., Srivastava G. 2002. Oxidative stress and antioxidant system in plants –*Cur. Sci.* **82** (10): 122-144.
- Ayyanan, A., Laribi, O. (2011). Perinatal exposure to bisphenol a increases adult mammary gland progesterone response and cell number. *Mol Endocrinol.* **25**(11),1915-23.

## Référence bibliographique

---

### B

---

- Balaguer, P., Bourguet, W. (2017). Caractérisation des interactions entre récepteurs nucléaires et perturbateurs endocriniens contenus dans l'alimentation. *Cah. Nutr. Diététique*. 52, 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2017.06.003>
- Barouki, R. (2016). Les perturbateurs endocriniens: 25 ans déjà. *Environ. Risques Santé* 1,22.
- Beltrand, J., Godot, C., Kerbouch, S., Lepage, N., Jourdon, I., Polak, M., Schmidt, M.E. (2017). Utilisation d'un serious game dans l'éducation thérapeutique des patients d'âges pédiatriques atteints de diabète de type 1: évaluation de l'intérêt et de l'adhérence chez des patients âgés de 10 à 16 ans. *Ann. Endocrinol.* 78, 203–204. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2017.07.749>
- Bergman, A., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, T. State of the Science of Endocrine Disrupting chemicals. (2012).
- Berryman, D., Houde, F., Deblois, C., O'Shea, M., (2003). Suivi des nonylphénols éthoxylés dans l'eau brute et l'eau traitée de onze stations de traitement d'eau potable au Québec. Dir. Suivi L'état L'environnement Ministère L'Environnement Qué. Envirodoq No ENV20030001.
- Biedermann, S., Tschudin, P., Grob, K. (2010). Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 398(1),571-576.
- Bindhumol, V., Chitra, K.C., Mathur, P.P. (2003). Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*.188(2-3),117-124.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 5(1), 9–19.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 5(1), 9–19.
- Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., Beaudoux, J.L., Peynet, J., Legrand, A., Delattre J. (2001). Aging and oxidative stress. Which potential markers? *Ann. Biol. Clin.*59(4), 453-459.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem*. 72, 248-254.
- Braun, J.M., Kalkbrenner, A.E., Calafat, A.M., Yolton, K., Ye, X., Dietrich, K.N., Lanphear, B.P. (2011). Impact of Early-Life Bisphenol A Exposure on Behavior and Executive Function in Children. *PEDIATRICS*. 128, 873–882. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-1335>

### C

---

- Cai, H., Harrison, D.G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87(10),840-844.

## *Référence bibliographique*

---

- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J.A., and Needham, L.L. (2008). Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* 116, 39–44.
- Cao, X., Corriveau, J., Popovic, S. (2009). Levels of bisphenol A incanned soft drink products in canadian markets. *J. Agric. FoodChem.*57,1307–1311.
- Cao, X., Corriveau, J., Popovic, S. (2009). Levels of bisphenol A incanned soft drink products in canadian markets. *J. Agric. FoodChem.*57,1307–1311.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.*305, 609-613.
- Carrière A., Galinier A., Fernandez Y., Carmona M.C., Pénicaud L., Casteilla L. 2006. Les espèces actives de l’oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. 22 (1): 47-53.
- Chavan, V.U., Melinkeri, R.R. (2013). Study of protein carbonyl group, nitric oxide and MDA (index of lipid peroxidation) as biomarkers of oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Natl J Community Med.*4(2),294-9.
- Choi, J.S., Islam, M.N., Ali. M.Y., Kim, E.J., Kim, Y.M., Jung, H.A. (2014). Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer’s disease and anti-inflammatory potential of apigenin. *Food and Chemical Toxicology.*64,27-33.
- Christin-Maitre, S., Vatie, C., Fève, B., (2016). Impact des estrogènes sur la glycorégulation. *Médecine Mal. Métaboliques* 10, 717–724.
- Clark, A.G., Hiron, P., Millburn, R.L., Smith and Williams, R.T. (1969). Reabsorption from the biliary system as a factor influencing the biliary excretion of organic anions. *Biochem j.* 115(5),62P.

## **D**

---

- Damstra,T.,2002.Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors:an assessment prepared by an expert group on behalf of the World Health Organization,the International Labour Organisation, and the United Nations Environment Programme. World Health Organization Bergman, A., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, T. (2012). State of the Science of Endocrine Disrupting chemicals.
- Danzl, E., Sei, K., Soda, S., Ike, M., Fujita, M. (2009). Biodegradation of Bisphenol A, Bisphenol F and Bisphenol S in Seawater. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 6, 1472–1484. <https://doi.org/10.3390/ijerph6041472>
- De Champlain, M., (2011). Effet des hormones stéroïdes sexuelles non traitées dans les effluents municipaux. Université de Sherbrooke.

## Référence bibliographique

---

Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D. 2005. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris. 405p.

Derbel, M., Igarashi, T., Satoh, T. (1993). Differential induction of glutathione S-transferase subunits by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and ethoxyquin in rat liver and kidney. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1158(2), 175-180.

DHI Water & Environnement (DHI). (2007). Study on enhancing the Endocrine Disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals. DHI, No. ENV.D.4/ETU/2005/0028r (DHI, Horsholm).

**Diamanti-Kandarakis, E.**, Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A.M. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 30(4):293-342.

Drewes, S.E., Georges, J., Khan, F. (2003). Recent findings on natural products with erectile-dysfunction activity. *Phytochemistry*. 62(7), 1019-1025.

Durando, M., Kass, L., Piva, J., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Luque, E.H., Munoz de Toro, M.M. (2006). Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect.* 10, 1289/ehp.

Duval, G., Simonol B., (2010). Les perturbateurs endocriniens : un enjeu sanitaire pour XXI<sup>ème</sup> siècle. *Air Pur.*

### E

---

Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., Grodsky, G. M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 23, 599-622.

### F

---

Facemire, C.F., Gross, T.S., Guilette, L.J.J. (1995). Reproductive impairment in the Florida panther: Nature of nurture ? *Environ. Health Perspect.* **103**, 79-86.

Fang Y, Zhou Y, Zhong Y, Gao X., Tan T (2013) Effect of vitamin E on reproductive functions and anti-oxidant activity of adolescent male mice exposed to bisphenol A. *Wei sheng yanjiu= Journal of hygiene research* 42(1); 18.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique.* 108-115.

Fetoui H., Makni M., Garoui E.M., Zeghal N. 2010. Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroids pesticide, on the rat kidney: involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 62: 593-599.

## *Référence bibliographique*

---

- Flint, S., Markle, T., Thomson, S., Wallace, E. (2012). Bisphenol A exposure effects and policy; a wildlife perspective. *J. Environ. Manag.* 104, 19–34.
- Folia, M., Boudalia, S., Ménétrier, F., Decocq, L., Pasquis, B. (2012). Oral homeostasis disruption by medical plasticizer component Bisphenol A in adult male rats. *The Laryngoscope*.
- Fry, D.M., Toone, C.K. (1981) DDT-induced feminization of gull embryos. *Science*. **213**(4510), 922-924.

### **G**

---

- Gioiosa, L., Fissore, E., Ghiradelli, G., Parmigiani, S, Palanza, P. (2007). Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Horm. Behav.* 52, 307-316.
- Goto, M., Ueda, K., Hashimoto, T., Fujiwara, S., Matsuyama, K., Kometani, T., Kanazawa, K. (2008). A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-. *Free Radical Biology and Medicine*. 45, 1318-1325.
- Greenberg, E.R., Barnes, A.B., Resseguie, L., Barrett, J.A., Burnside, S. (1984). Breast cancer in mothers given diethylstilbestrol in pregnancy. *N Engl J Med*. 311: 1393-8.
- Grün, F., Blumberg, B. (2007). Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 8(2). 161-171.
- Guillette, L.J., CRAIN, D.A., Gunderson, M.P., Kools, S.A.E., Milnes, M.R., Orlando, E.F. (2000). Alligators and endocrine disrupting contaminants: a current perspective. *Am. Zool.* **40**, 438-452.
- Guillette, L.J., Groos, T.S, Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R. (1994) Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* **102**, 680-688.
- Gurmeet K., Rosnah I., Normadiah, M.K., Das S, Mustafa, A.M. (2014). Detrimental effects of bisphenol A on development and functions of the male reproductive system in experimental rats. *EXCLI journal*. 13; 151-160.

### **H**

---

- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *BiolChem.* (22), 7130-7139.
- Halliwell, B. (1989). Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol.* 70, 737 – 757.
- Hanioka, N., Naito, T., Narimatsu, S. (2008). Human UDP glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere*. 74(1). 33–6.

## Référence bibliographique

---

- Harman, D. (2000). Aging: overview. *Ann. NY. Acadsci.* 928 :1–21. Sisein E.A. 2014. Biochemistry of Free Radicals and Antioxidants. *Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB). Sch. Acad. J. Biosci.* 2(2): 110-118.
- Hashem, M.A., Neamat-Allah, A.N.F., Hammza, H.E.E. et al. (2020) Impact of dietary supplementation with *Echinacea purpurea* on growth performance, immunological, biochemical, and pathological findings in broiler chickens infected by pathogenic *E. coli*. *Trop Anim Health Prod.* **52**, 1599–1607. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02162-z>
- Hassan, Z.K, Elobeid, M.A., Virk, P., Omer, S.A., ElAmin, M., Daghestani, M.H., AlOlayan, E.M. (2012). Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxidative medicine and cellular longevity*; PMID:22888396.
- Heba, S., AboulEzz, Yasser, A., Khadrawy, Iman, M. Mourad. (2015). The effect of bisphenol A on some oxidative stress parameters and acetylcholinesterase activity in the heart of male albino rats. *Cytotechnology.* 67(1); 145-155.
- Herbst, A.L., Ulfelder, H., Poskanzer, D.C. (1971). Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med.* 284: 878-81.
- Ho, S.M., Tang, W.Y. (2006). Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res.* 66(11), 5624-32.
- Hoekstra, E., Simoneau, C. (2013). Release of bisphenol A from polycarbonate—a review. *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 386–402.
- Hould, R. (1984). *Techniques d’histopathologie et de cytopathologie.* Ed Maloine. 19(21), 225-227.

## I

---

- Inoue, K., Wada, M., Higuchi, T., Oshio, S., Umeda, T., Yoshimura, Y. (2002). Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 773(2), 97-102.
- INRS. (2010) . Fiche Toxicologique : Bisphenol A.

## J

---

- Jandegian, C.M., Deem, S.L., Bhandari, R.K., Holliday, C.M., Nicks, D., Rosenfeld, C.S., Tillitt, D.E., VomSaal, F.S., Vélez-Rivera, V., Yang Y., Holliday, D.K. (2015) .Developmental exposure to bisphenol A (BPA) alters sexual differentiation in painted turtles (*Chrysemys picta*). *General and Comparative Endocrinology.* 216, 77-85.

**Jeanblanc, A.** Distilbène : des effets délétères sur trois générations ou plus... *Le Point.* Décembre 2014.

## *Référence bibliographique*

---

- Jenkins, S., Raghuraman, N., Eltoum, I., Carpenter, M., Russo, J., Lamartiniere, C.A. (2009). Oral exposure to bisphenol A increases dimethylbenzanthracene-induced mammary cancer in rats. *Environ Health Perspect.* 117 (6),910-915.
- Jin, P., Wang, X., Chang., F., Bai, Y., Li, Y., Zhou, R., Chen, L. (2013). Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *Journal of biomedical research.*27(2); 135-144.
- Jobling, S., Coey, S.,Whitmore, J.G., Kime,D.E., Van look, K.J., Mcallister, B.G. (2002). Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biol. Reprod.*67, 515- 524.
- John, N., Rehman, H., Raza, S., David, M., Ullah, W., Afsar, T., ...&Jahan, S. (2019). Comparative study of environmental pollutants bisphenol A and bisphenol S on sexual differentiation of anteroventral periventricular nucleus and spermatogenesis. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 17(1), 53.
- Jollow, D.J., Mitche,l. J.R, Zampaglione, Z., Gillette, J.R. (1974). Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites. *Pharmacology.*11,51-57.
- Juraska, J.M., Sisk. C.L., DonCarlos, L.L. (2013). Sexual differentiation of the adolescent rodent brain: hormonal influences and developmental mechanisms. *Horm. Behav.*64 (2), 203–210.

## **K**

---

- Kabuto, H., Amakawa, M., Shishibori., T. (2004). Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life sciences.*74(24), 2931-2940.
- Kaddar, N., Harthe , C., Dechaud, H., Mappus, E., and Pugeat, M. (2008). Cutaneous penetration of bisphenol A in pig skin.*J Toxicol Environ Health A.*71(8): p.471-3.
- Kaddar, N., Harthe, C., Dechaud, H., Mappus, E., and Pugeat, M. (2008). Cutaneous penetration of bisphenol A in pig skin. *J Toxicol Environ Health A.*71(8).471-3.
- Kalender Y., Kayaa S., Durakb D., Uzuna F.G., Demir F. 2012. Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. *Environmental toxicology and pharmacology.* 33: 141–148.
- Kalfa , N., Paris, F., Soyer-Gobillard, M.O., Daures, J.P., Sultan, C. (2011). Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. *Fertility and sterility.*95: 2574-7.

## *Référence bibliographique*

---

- Kamrin, F. (2004). Bisphenol A: a scientific evaluation: what is the toxicity of BPA? *MedGenMed.* 6, 7–17.
- Kang, J.H., Kondo, F., Katayama, Y. (2006). Human exposure to bisphenol A. *Toxicology.*226(2-3):79-89.
- Kavlock, R. J., ANKLEY, G.T. (1996). A perspective on the risk assessment process for endocrine-disruptive effects on wildlife and human health. *Risk Anal.* **16**(6), 731-739.
- Kazemi, S., Feizi, F., Aghapour, F., Joorsaraee, G. A., & Moghadamnia, A. A. (2016). Histopathology and histomorphometric investigation of bisphenol a and nonylphenol on the male rat reproductive system. *North American journal of medical sciences,* 8(5),215.
- Kim, J.Y, Han, E.H, Kim., H.G, Oh, K.N, Kim, S.K., Lee, K.Y., Jeong, HG.(2010) .Bisphenol A-induced aromatase activation is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in rat testicular Leydig cells. *Toxicology Letters.* 193(2), 200-208.
- Knaak, J.B., Sullivan, L.J. (1966) Metabolism of bisphenol A in the rat. *Toxicology and applied pharmacology.* 8(2),175-184.
- Korkmaz, A., Ahabab, M.A., Kolankaya, D., Barlas, N. (2010). Influence of vitamin C on bisphenol A., nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food and Chemical Toxicology.*48(10),2865-2871.
- Kourouma, A., Peng, D., Chao, Q., Changjiang, L., Chengmin,W., Wenjuan, F., Suqin, Q., Tingting, Y., Kedi, Y. (2014). Bisphenol A induced reactive oxygen species (ROS) in the liver and affect epididymal semen quality in adults Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences.* 6(4); 103-112.
- Kubo, K.O., Arai M, Omura, R.,Watanabe , R., Ogata. (2003). Effets de faibles doses de bisphénol A sur la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement chez les rats- *Neurosci. Res.*45,345-356.
- Kumar, V., Chakraborty, A., Kural, M.R., Roy, P. (2009). Alteration of testicular steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. *Reproductive toxicology.*27(2),177-185.
- Kurebayashi, H., Okudaira, K., Ohno, Y. (2010). Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicol.*198,210-215.

## **L**

---

- Lakind, J.S., Naiman, D.Q .(2011) .Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005–2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of exposure science & environmental epidemiology.*21(3),272-279.

## *Référence bibliographique*

---

- Lamartiniere, C.A., Jenkins, S., Betancourt, A.M., Wang, J., Russo, J. (2011). Exposure to the endocrine disruptor bisphenol A alters susceptibility for mammary cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig.*5(2),45-52.
- Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A., Henley, W.E., Depledge, M., Wallace, R.B, Melzer, D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama.*300(11),1303-1310.
- Lefort, É.C, Blay, J. (2013). Apigenin and its impact on gastrointestinal cancers. *Molecular nutrition & food research.*57(1), 126-144.
- Liao, C., and Kannan, K. (2011). Widespread occurrence of bisphenol A in paper and paper products: implications for human exposure. *Environ Sci Technol.*45(21): 9372-9.
- Liu, C., Duan, W., Li R., Xu, S., Zhang, L., Chen, C., ...&Luo, X.(2013). Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell death &disease.* 4(6), e676-e676.
- Loganathan, S.N., and Kannan, K. (2011). Occurrence of bisphenol a in indoor dust from two locations in the eastern United States and implications for human exposures. *Arch Environ Contam Toxicol.*61(1): p.68-73.
- ### M
- 
- Macon, M.A. and Fenton, S.E. (2013). Endocrine disruptors and the breast : early life effects and later life disease. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.*18,43-61.
- Maia, J., Cruz, J., Sendón, R., Bustos, J., Sanchez, J., Paseiro, P. (2009). Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. *Food Res.Int.*42,1410–1414.
- Mantovani A. (2002). Hazard identification and risk assessment of endocrine disrupting chemicals with regard to developmental effects. *Toxicology.* 181, 367-370.
- Marmugi, A., Ducheix S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris A., Priymenko, N., ... & Mselli-Lakhal, L. (2012). Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology* 55(2), 395-407.
- Marquet, F., Payan, J.P., Beydon, D., Wathier, L., Grandclaude, M.C., and Ferrari, E. (2011) In vivo and ex vivo percutaneous absorption of [(14)C]-bisphenol A in rats: a possible extrapolation to human absorption? *Arch Toxicol.* 85(9): p.1035-43.
- Marquet, F., Payan, J.P., Beydon, D., Wathier, L., Grandclaude, M.C., and Ferrari, E. (2011). In vivo and ex vivo percutaneous absorption of [(14)C]-bisphenol A in rats: a possible extrapolation to human absorption? *Arch Toxicol.*85(9): p.1035-43.
- Matthews, J.B., Twomey, K., and Zacharewski, TR. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol.*14(2),149-57.

## *Référence bibliographique*

---

- Mc Michael, M. 2007. Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. *JAVMA*. 231(5): 714-720.
- Melzer, D., Rice, N.E, Lewis, C., Henley, W.E, Galloway TS. (2010). Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS one*5: e8673.
- Moller P., Wallin H., Knudsen L.E. 1996. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-Biological Interactions*. 102 (1):17-36.
- Moon, M.K, Kim., M.J, Jung, I.K, Koo, Y.D, Ann, H.Y., Lee, K.J., Kim, S.H., Yoon, Y.C., Cho, B.J., Park, K.S., Jang, H.C., Park, Y.J. (2012). Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *Journal of Korean Medical Science*. 27(6), 644-652.
- Mourad, I.M., Khadrawy, Y.A. (2012). The sensitivy of liver, kidney and testis of rats to oxidative stress induced by different doses of bisphenol A. *LifeSciJ*.(1)50, 19.
- Multigner , L., (2008). Perturbateurs endocriniens, concepts et réalité. *Archives de Maladies Professionnelles et de l'environnement*.69 ,710 - 717.
- Munir, B., Qadir A.; Tahir M. (2017). Negative effects of bisphenol A on testicular functions in albino rats and their abolitions with Tribulustersteris L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.53,(3).
- Munkittrick, K.R., Miller , P.A., Barton ,D.R., Dixon, D.G. (1991). Altered performance of white sucker populations in the Manitouwadge chain of lakes is associated with changes in benthic macroinvertebrate communities as a result of copper and zinc contamination. *Ecotox.Environ. Safe*. **21**(3), 318-326.
- Munoz-de-Toro , M., Markey, C., Wadia, P.R., Luque, E.H., Rubin, B.S., Sonnenschein, C. (2005). Perinatal exposure to bisphenol A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology*.146,4138-4147.
- Murray, T.J., Maffini, M., Sonnenschein, C., Soto, A.M. (2007). Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphénol a exposure. *Reprod. Toxicol*.23(3),383-390.
- N**
- N'tumba-Byn, T., Moison, D., Lacroix, M., Lecureuil, C., Lesage, L., Prud'homme , S., Pozzi-Gaudin , S., Frydman, R., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V. (2012). Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal Leydig cell function. *PLoS One*, 7:e51579.
- Nam, S., Seo, Y., Kim, M. (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*. 79,949-952.

## *Référence bibliographique*

---

Nikaido, Y., Yoshizawa, K., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Yuri, T., Uehara, N., Tsubura, A. (2004). Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol.*18(6),803-811.

### **O**

---

Olukole, S.G, Lanipekun, D.O., Ola-Davies, E.O., Oke, B.O. (2019). Melatonin attenuates bisphenol A-induced toxicity of the adrenal gland of Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research.*26(6), 5971-5982.

### **P**

---

Panagiotidou, E., Zerva, S., Mitsiou, D.J, Alexis, M.N., Kitraki, E. (2014). Perinatal exposure to low dose bisphenol A affects the neuroendocrine stress response in rats. *J. Endocrinol.* 220 (3),207–218.

Patel, D., Shukla, S., Gupta, S. (2007). Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise. *International journal of oncology.* 30(1), 233-245.

Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O.2002. Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxydant défoncees. *Nutrition clinique et métabolisme.* 16: 233-239.

Pinson, A., Franssen, D., Gérard, A., Parent, A.-S., Bourguignon, J.-P. (2017). Neuroendocrine disruption without direct endocrine mode of action: Polychlorobiphenyls (PCBs) and bisphenol A (BPA) as case studies. *C. R. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2017.07.006>

Pottenger, L.,H., Domoradzki, J.Y., Markham, D.A., Hansen, S.C, Cagen, S.Z., Waechter, J.M., J.r. (2000). The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci.*54(1),3-18.

Powers, S., Jackson, M. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 88,1243-1276.

Prins, G.S., Birch, L. (2007). Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol* 23(3), 374-82.

Prins, G.S., Tang, W.Y, Belmonte, J., Ho, S.M. (2008). Developmental exposure to bisphenolA increases prostate cancer susceptibility in adult rats: epigenetic mode of action is implicated.*Fertility and sterility.* 89(2), e41.

Pupo, M., Pisano, A., Lappano, R., Santolla, M.F., De Francesco, E.M., Abonante S, ... &Maggiolini M. (2012). Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environmental health perspectives.* 120(8),1177-1182.

## Référence bibliographique

---

### Q

---

Qiu, W., Chen, J., Li, Y., Chen, Z., Jiang, L., Yang, M., Wu, M. (2016). Oxidative stress and immune disturbance after long-term exposure to bisphenol A in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and environmental safety*. 130, 93-102.

### R

---

Rachel, E., Bowman, V.L., Samantha, D.W., Hamed, K., Sarah D., Maya. Francfort. (2015). Bisphenol A exposure during adolescence leads to enduring alterations in cognition and dendritic spine density in adult male and female rats. *Hormones et comportement*. 69, 89-97.

Ramirez, D.C., Gomez-Mejiba, S.E., Corbett, J.T., Deterding, L.J., Tomer, K.B., Mason R.P. (2008). Cu/Zn-Superoxide Dismutase-driven Free Radical Modifications: Copper-and Carbonate Radical Anion-initiated Protein Radical Chemistry. *Biochemical Society*. 10, 1-25.

Rašković, A., Pavlović, N., Kvirgić, M., Sudji, J., Mitić, G., Čapo, I., Mikov, M. (2015). Effects of pharmaceutical formulations containing thyme on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *BMC complementary and alternative medicine*. 15(1), 1-11.

Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R., and vom Saal, F.S. (2007). In Vivo Effects of Bisphenol A in Laboratory Rodent Studies. *Reprod. Toxicol.* Elmsford N 24, 199–224.

**Richter, C.A.**, Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R., vom Saal, F.S., (2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod. Toxicol.* 24, 199-224. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.06.004>

Rithidech, K.N., Tungjai, M., Reungpatthanaphong, P., Honikel, L., Simon, S.R. (2012). Attenuation of oxidative damage and inflammatory responses by apigenin given to mice after irradiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 749(1-2), 29-38.

Robineau P., Mercier T. 2012. Quelle évaluation pour les produits phytopharmaceutiques Which assessment for plant protection products *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*. 6 : 927–933.

Robineau, P., Mercier, T. (2012). Quelle évaluation pour les produits phytopharmaceutiques Which assessment for plant protection products *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*. 6, 927–933.

Ross J.H., Driver J.H., Lunchick C., Wible C., Selman F. 2006. Pesticide exposure monitoring databases in applied risk analysis. *Rev Environ Contam Toxicol*. 186: 107-32.

## Référence bibliographique

---

Rubin, B.S. (2011). Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem.Mol. Biol.*127, 27–34.

Rubin, B.S., Murray, M.K., Damassa, D.A., King, J.C., Soto, A.M. (2001). Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environmental health perspectives.* 109(7), 675-680.

### S

---

Saal, F., Nagel, S., Coe, B., Angle, B, Taylor, J. (2012). The estrogenicendocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity.*Mol. Cell. Endocrinol.*354, 74–84.

Salian S., Doshi T., Vanage, G. (2009). Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology.*265(1-2), 56-67.

Salian, S., Doshi, T., Vanage, G. (2011). Perinatal exposure of rats to bisphenol A affects fertility of male offspring- an overview. *Reproductive Toxicology.* 31(3),359-362.

Saoudi, M., Messarah, M., Boumendjel A., Jamoussi, K., El Feki A. (2011). Protective effects of vitamin C against haematological and biochemical toxicity induced by deltamethrin in male Wistar rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*74, 1765-1769.

Schecter, A., Malik, N., Haffner, D., Smith, S., Harris, T.R., Paepke, O., & Birnbaum, L. (2010). Bisphenol a (BPA) in US food. *Environmental science &technology.*44(24),9425-9430.

Sergent, O., Griffon, B., Cillard, P., Cillard, J. (2000). Alcool et stress oxydatif. *Pathol. Biol.* 49,689-695.

Sharma, H., Kanwal, R., Bhaskaran, N., Gupta, S. (2014). Plant flavone apigenin binds to nucleic acid bases and reduces oxidative DNA damage in prostate epithelial cells. *PLoS One.* 9(3), e91588.

Shimizu, M., Ohta, K. (2002). Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells.*Toxicol In Vitro.* 16(5),549-56.

Singh, J.P.V., Selvendiran, K., Banu, S.M., Padmavathi, R., Sakthisekaran, D. (2004). Protective role of Apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. *Phytomedicine.* 11(4), 309-314.

Sisein E.A. 2014. Biochemistry of Free Radicals and Antioxidants.*Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB).* Sch. Acad. J. Biosci. 2(2): 110-118.

### T

---

## *Référence bibliographique*

---

- Takahashi, O., Oishi, S. (2001). Testicular toxicity of dietary 2, 2-bis (4-hydroxyphenyl) propane (bisphenol A) in F344 rats. *Archives of toxicology*. 75(1), 42-51.
- Tessier F., Marconnet P. 2015. Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports*. 10(16): 1-13.
- Timms, B.G., Howdeshell, K.L., Barton, L., Bradley,S., Richter, C.A., vom Saal, F.S. (2005). Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci USA*.102(19),7014-7019.
- Titus-Ernstoff , L., Troisi, R., Hatch, E.E., Palmer, J.R., Hyer, M . (2010). Birth defects in the sons and daughters of women who were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *International journal of andrology* .33: 377-84.
- Titus-Ernstoff, L.**, Troisi, R., Hatch, E.E., Palmer, J.R., Hyer, M. (2010). Birth defects in the sons and daughters of women who were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *International journal of andrology*.33: 377-84.
- Tohei, A., Suda, S., Taya, K., Hashimoto, T., Kogo, H .(2001). Bisphenol A inhibits testicular functions and increases luteinizing hormone secretion in adult male rats. *Experimental biology and medicine*.226(3),216-221.
- Tostain, J., Rossi, D., Martin, P.M., 2004. Physiologie des androgènes chez l'homme adulte. *Prog Urol*. 14, 639–660.
- Tsaroucha, A.K., Tsiaousidou, A., Ouzounidis, N., Tsalkidou E., Lambropoulou, M., Giakoustidis, D., Chatzaki, E., Simopoulos, C. (2016). Intraperitoneal administration of apigenin in liver ischemia/reperfusion injury protective effects. *Saudi journal of gastroenterology* .22(6), 415-422.
- Tsumbu, C.N., Deby-Dupont, G., Tits, M., Angenot L., Frederich, M., Kohnen, S., Mouithys-Mickalad, A., Serteyn, D., Franck, T. (2012). Polyphenol content and modulatory activities of some tropical dietary plant extract on the oxidant activities of neutrophils and myeloperoxidase. *Int.J. Mol*.13,628-650.

## **V**

---

- Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxydants in oxydative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160: 1-40.
- Vandenberg, L., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol*.24, 139–177.
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs,D.R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal,F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T., Myers,J.P. (2012). hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr. Rev*.33, 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>

## *Référence bibliographique*

---

- Vawda, A.I., Mandlwana, J.G. (1990). The effects of dietary protein deficiency on rat testicular function. *Andrologia*. 22(6), 575-583.
- Viguié, C., Collet, S.H., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Puel, S., Roques, B.B., Toutain, P.L., Lacroix, M.Z. (2012). Maternal and Fetal Exposure to Bisphenol A Is Associated with Alterations of Thyroid Function in Pregnant Ewes and Their Newborn Lambs, *Endocrinology*. 154 (1), 521-8.
- Vogel, S. A. (2009) ." The politics of plastics : the making and unmaking of bisphenol a "safety". *Am J Public Health* 99 Suppl 3 : S559-66.
- Volkel W, Colnot T. 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15(10): 1281-7.
- Volkel, W., Bittner, N. (2005). Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*. 33(11), 1748-57.
- Volkel, W., Kiranoglu, M., and Fromme, H. (2008). Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett*, 179(3): p.155-62.
- Vom Saal, F.S., Akingbemi, B.T., Belcher, S.M., Birnbaum, L.S. Crain, D.A., Eriksen, M. 2007. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol*. 24 (2), 131-8.
- Vom saal, F.S., Cooke, P.S., Buchana, D.L., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., et al. (1998). A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol. Ind. Health*. 14(1-2), 239-260.
- W**
- 
- Wang, E., Chen, F., Hu, X., Yuan, Y. (2014). Protective effects of apigenin against furan-induced toxicity in mice. *Food & function*. 5(8), 1804-1812.
- Wang, J., Wang, Y.-Y., Lin, L., Gao, Y., Hong, H.-S., and Wang, D.-Z. (2012b). Quantitative proteomic analysis of okadaic acid treated mouse small intestines reveals differentially expressed proteins involved in diarrhetic shellfish poisoning. *J. Proteomics*. 75, 2038–2052.
- Welshons, W.V, Nagel, S.C, vomSaal, F.S. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*. 147(6), s56-s69.
- Wilson, N.K., Chuang, J.C., Morgan, M.K., Lordo, R.A., and Sheldon, L.S. (2007). An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environ Res*. 103 (1): p.9-20.

## *Référence bibliographique*

---

Wolff, M.S., Teitelbaum, S.L., Windham, G., Pinney, S.M., Britton, J.A., Chelimo, C., Godbold, J., Biro, F., Kushi, L.H., Pfeiffer, C.M., Calafat, A.M. (2006). Pilot Study of Urinary Biomarkers of Phytoestrogens, Phthalates, and Phenols in Girls. *Environ. Health Perspect.* 115,116-121. <https://doi.org/10.1289/ehp.9488>

Wu, M., Xu, H., Shen, Y., Qiu, W., Yang, M. (2011). Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture. *Environmental toxicology and chemistry.* 30(10),2335-2341.

### **Y**

---

Yamasaki, K., Takeyoshi, M., Noda S., Takatsuki, M. (2002) .Subacute oral toxicity study of ethynyl estradiol and bisphenol A, based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline no. 407'. *Archives of Toxicology.* 76(2), 65-74.

Yang, J., Wang, X.Y., Xue, J., Gu ZL, Xie, M.L. (2013). Protective effect of apigenin on mouse acute liver injury induced by acetaminophen is associated with increment of hepatic glutathione reductase activity. *Food & function.* 4(6), 939-943.

Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H., Ikushiro, S. (1999). Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDPglucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J.*340.( Pt 2),405-9.

Yousaf, B., Amina, Liu, G., Wang, R., Qadir, A., Ali, M.U., Kanwal, Q., Munir B., Asmatullah, Abbas., Z. (2016). Bisphenol A exposure and healing effects of *Adiantumcapillus-veneris* L. plant extract (APE) in bisphenol A-induced reproductive toxicity in albino rats. *Environmental Science and Pollution Research.* 23(12), 11645-11657.

### **Z**

---

Zalko, D., Jacques, C. (2011). Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere.*82 (3): 424-30.

Zhang, G.L., Zhang, X.F. (2012). Exposure to bisphenol A results in a decline in mouse spermatogenesis. *Reprod Fertil Dev.*

Zhang, H.Q., Zhang, X.F. (2011). Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes. *Mol Biol Rep.*39(5), 5651-7.

Zhang, S., Qin, C., Safe, S.H. (2003). Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environmental health perspectives.* 111(16),1877-1882.

Zoeller, R.T., Brown, T.R., Doan, L.L. (2012) Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology.* 153:4097–4110. Doi : 10.1210/en.2012-1422

## *Référence bibliographique*

---