

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

## THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT

Spécialité : Biologie Animale et Environnementale  
Option : Écophysiologie Animale

### THEME

Évaluation des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et en vitamine E contre les désordres physiopathologiques induits par le bisphénol A chez les rats males de la souche Wistar.

Présentée par : M<sup>elle</sup> AMRAOUI Wahiba

Directeur de thèse : MESSARAH Mahfoud

Professeur, Université de Annaba

Membres de Jury:

Président : Mr ABDENNOUR Cherif

Professeur, Université d'Annaba

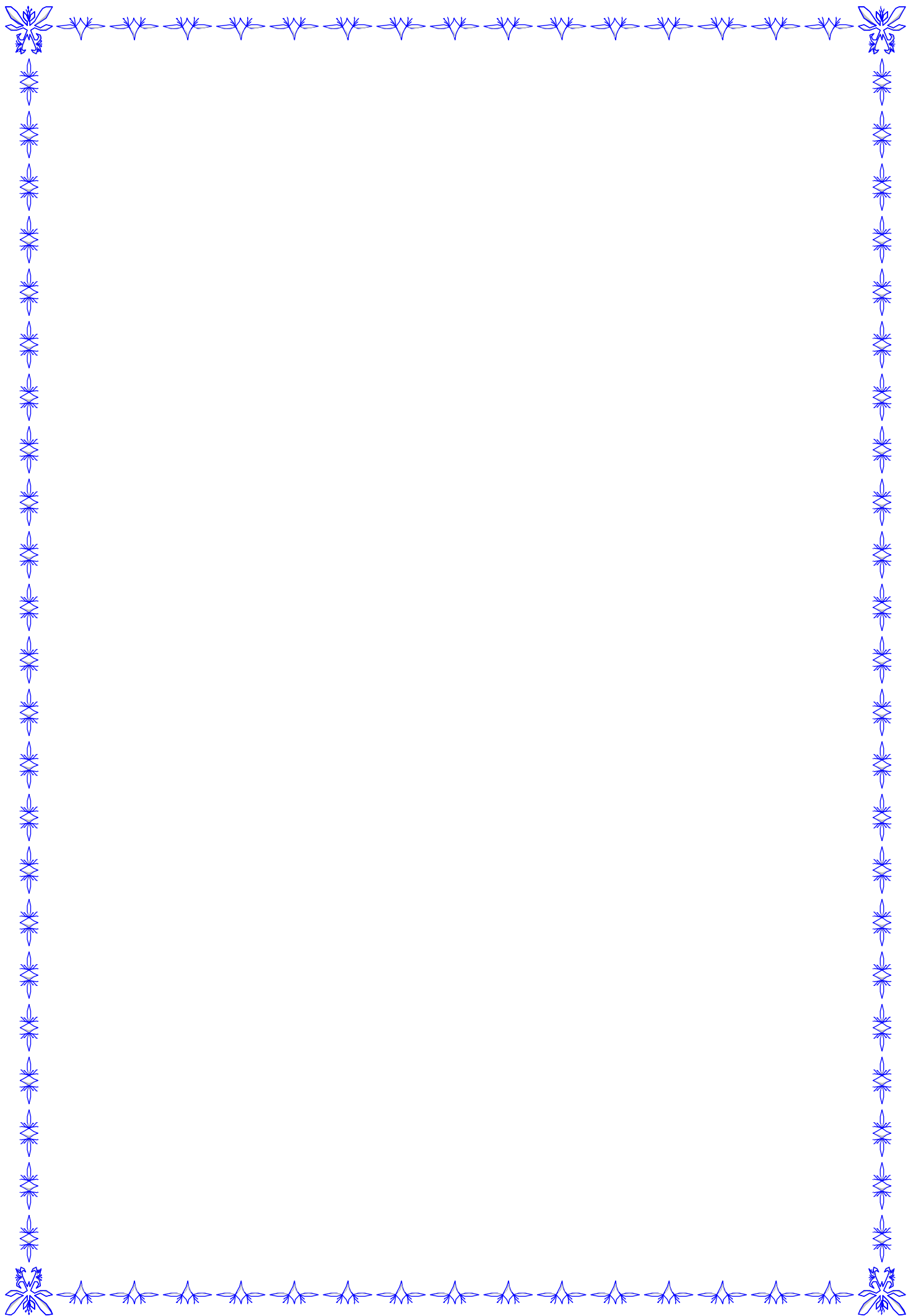
Examineurs : Mr KHELLILI Kamel

Professeur, Université d'Annaba

Mme SLIMANI Souheila

Maître de conférences A, Université de Skikda

Année universitaire : 2018/2019



## Remerciements

*Louange à **ALLAH** le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de cette thèse.*

*La rédaction de ces pages clôt une aventure de cinq ans qui n'a pas toujours été facile et je tiens à exprimer ma reconnaissance à tous ceux et celles qui, par leur soutien, leur aide et leurs encouragements, ont contribué, de près ou de loin, à la concrétisation de ce travail*

**À mon Directeur de Thèse,**

*Monsieur **MESSARAH Mahfoud**, Directeur du laboratoire de Biochimie et de Toxicologie environnementale à l'université de BADJI MOKHTAR, Annaba. Qui m'a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse, pour le temps qu'il m'a consacré, son aide constant et ses conseils avisés.*

*J'ai beaucoup apprécié de travailler à vos côtés, pour votre dynamisme, votre franchise, votre rigueur, votre soutien et disponibilité au quotidien et pour tous commentaires et critiques qu'ont permis l'amélioration du manuscrit final.  
Qu'il trouve ici, en ces mots simples, toute ma reconnaissance.*

**À Mon Jury,**

*Monsieur **ABDENNOUR Cherif**, Directeur du laboratoire d'Écophysiologie et d'Écologie Animale à l'université de BADJI MOKHTAR, Annaba.  
Que je remercie, par anticipation d'avoir accepté de juger ce modeste travail et de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.  
Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond respect.*

*Monsieur **KELLILI Kamel**, Professeur au département de biologie à l'université de BADJI MOKHTAR, Annaba. Auquel je témoigne ma gratitude pour l'intérêt qu'il a porté à ce modeste travail en acceptant de l'examiner. J'exprime ma profonde gratitude.*

*Madame **SLIMANI Souhila**, maitre-assistant à l'université 20 Aout 1956, Skikda.  
Que je remercie de l'honneur qu'elle me fait d'être partie de ce jury et d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.  
Qu'elle soit assurée aussi de ma profonde reconnaissance.*

*Je n'oublierai pas de remercier, Professeur **SOLTANI Noureddine**,  
Professeur **DAAS Tarek** et **M<sup>me</sup> MAAMCHA DAAS Ouided**,  
Pour m'avoir bien accueillie au sein de leurs laboratoires.*

*Ainsi, le Professeur **TAHAR Ali**, notre biostatisticien pour son disponibilité.*

*Mais également pour leurs sympathies et leurs encouragements.*

*Veillez accepter, l'assurance de mon estime et profond respect.*

*À mes chers amis (es) : **Faiza, Iméne, Khaoula, Mouna, Nesrine, Sara, Yakouta, Zahra***

***Amine, Imed, Khaled et Salem**, autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes*

*soient-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance.*

*Vous avez su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi  
face aux difficultés de la vie.*

*Un remerciement particulier et sincère à **Tayeb, Linda** et surtout **Rym**,*

*Pour toute l'ambiance dont vous m'as entourée, pour votre aide, support et tout effort fourni.*

*Je réserve une mention particulière à ma tante **Baya**, ma tante **Toma**,*

*mon oncle **Sahraoui**, ma grande sœur **Wafa** et mon **papa**.*

*Vos conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Votre patience sans fin,  
votre compréhension et votre encouragement sont pour moi le soutien indispensable que vous  
avez toujours su m'apporter.*

*Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon  
mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir.*

*Que Dieu le tout puissant vous protège de tout mal.*

*Également, à tous mes collègues d'enseignement M<sup>me</sup> **CHOUABIA Amel**, Mr **Hamel Tarek**,  
Mr **Slimani Rachid**, M<sup>me</sup> **BOUKHDIR Sameh**, M<sup>me</sup> **SHERNINE Saoussen**, M<sup>me</sup> **SALHI**  
**Amina** et mes étudiants.*

*À toute personne que je n'ai pas mentionnée son nom mais j'aurais jamais oublié les  
moments agréables que j'ai bien partagé avec eux,*

***Puisse Dieu le tout puissant exhausser tous vos vœux.***

# الإهداء

إلى ذكرى والدتي...

التي غرست داخلني حب العلم وشجعتني على البحث دائما عن الأجوبة الممنوعة.

رحمها الله

إلى ذكرى أستاذي...

البروفيسور بو لعقود محمد الصالح، الذي دفعني دوما إلى الرخص نحو الصعاب وتحديها.

رحمه الله

إليك أبي...

سندي ورفيق دربي، يكفيني ثقتك وصبرك معي. لولاك ما وصلت إلى هنا

حفظك الله لنا

إليكم إخوتي...

وفاء، صفاء، ضياء وعلاء... نبضات قلبي.

حفظكم الله وأدام جمع شملنا

"ظهر الفساد في البر والبحر بما كسبت أيدي الناس  
ليذيقهم بعض الذي عملوا لعلهم يرجعون"

الروم: الآية.41

*"La corruption est apparue sur la terre et dans la mer à cause de ce que les gens ont accompli de leurs propres mains ; afin qu' [Allah] leur fasse goûter une partie de ce qu'ils ont œuvré ; peut-être reviendront-ils (vers Allah)"*

Ar-Room : Aya.41

*" Corruption has appeared throughout the land and sea by [reason of] what the hands of people have earned so He may let them taste part of [the consequence of] what they have done that perhaps they will return [to righteousness] "*

Ar-Room : Aya.41



# *Résumés*

## Résumé

Le présent travail consiste à étudier la toxicité du bisphénol A (BPA) ; une molécule utilisée intensivement dans l'industrie de la plastique ; et ses impacts sur quelques paramètres de la fonction hépatique, rénale et reproductrice chez le rat et de tester les effets modulateurs de la supplémentation en sélénium et en vitamine E sur la cytotoxicité induite par ce plastifiant. Trente-deux rats mâles de la souche Wistar ont été répartis en quatre groupes de 08 rats chacun ; groupe témoin (T) a reçu l'huile d'olive par gavage et soumis sous un régime standard (RS). Groupe (Se+Vit E) a reçu l'huile d'olive par gavage et soumis sous un régime enrichi en sélénium (0.5mg/kg aliment) et en vitamine E (100mg/kg aliment) (RS/ (Se+Vit E). Groupe BPA a été gavé par 10mg/kg.p.c du bisphénol A dissout dans l'huile d'olive et soumis sous un régime standard et un quatrième groupe BPA/ (Se+Vit E) a été gavé par 10mg/kg.p.c du bisphénol A dissout dans l'huile d'olive et soumis sous un régime enrichi en sélénium et en vitamine E pendant trois semaines.

Les résultats obtenus, après l'administration du BPA à 10mg/kg.p.c par gavage pendant 3 semaines, montrent que le BPA est incriminé dans l'augmentation de la croissance corporelle chez les rats traités par ce plastifiant. Nos résultats ont montré également que le BPA a provoqué des perturbations au niveau des paramètres biochimiques (glucose, bilirubine, cholestérol, triglycérides, l'albumine, HDL-ch, urée, créatinine) et hormonale (LH et testostérone). De plus, une surproduction des ROS a été générée induisant un taux élevé de la peroxidation lipidique (augmentation de malondialdéhyde, MDA) et un déclin du taux de glutathion réduit (GSH) au niveau du foie, rein, testicule et cerveau. Par ailleurs, une diminution de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion-s-transférase (GST) et la catalase (CAT) tissulaire a été enregistré chez le groupe (BPA) par rapport au groupe témoin.

Ces perturbations biochimiques sont confirmées par les données histologiques. La supplémentation en sélénium et en vitamine E offre une protection contre la cytotoxicité induite par le BPA basée sur le piégeage des radicaux libres.

**Mots clés :** bisphénol A, cytotoxicité, sélénium, vitamine E, rat, balance métabolique.

## *Abstract*

The present work is conducted to study the toxicity of bisphenol A; a monomer used extensively in the plastics industry; and its impacts on some parameters of liver, kidney and reproductive function. Furthermore, to test the modulatory effects of selenium and vitamin E supplementation on the cytotoxicity induced by this plasticizer. Thirty-two male rats of the Wistar strain were randomly divided into four groups of eight rats each; control group received orally olive oil and was given standard diet. (Se+Vit E) group received orally olive oil and was given diet enriched with Selenium (0.5mg/kg diet) and Vitamin E (100mg/kg diet). BPA group was orally administered 10mg/kg b.w of Bisphenol A dissolved in olive oil and was given a standard diet. Fourth group BPA/(Se+Vit E) was orally administered 10mg/kg b.w of bisphenol A dissolved in olive oil and was given diet enriched with Selenium and Vitamin E for three weeks.

The gotten results, after the administration of BPA at 10mg/kg b.w for three weeks, show that BPA is convicted by increasing body weight of rats treated with this plasticizer. Our results have also shown that BPA has caused a disruption in biochemical parameters (glucose, bilirubin, cholesterol, triglycerides, albumin, HDL-ch, urea, creatinine) and hormonal (LH, testosterone). In addition, an overproduction of ROS induced high levels of lipid peroxidation (increased of malondialdehyde, MDA) and a decline in reduced glutathione (GSH) levels in the liver, kidney and testis. Furthermore, a decrease in the enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPx), glutathione-s-transferase (GST) and catalase (CAT) was noticed in the same group as compared to the control.

These biochemical disruptions were confirmed by the histopathological findings. Supplementation with selenium and vitamin E give a protection against the cytotoxicity induced by BPA based on trapping free radicals.

**Key words:** Bisphenol A, cytotoxicity, selenium, vitamin E, rat, metabolic balance

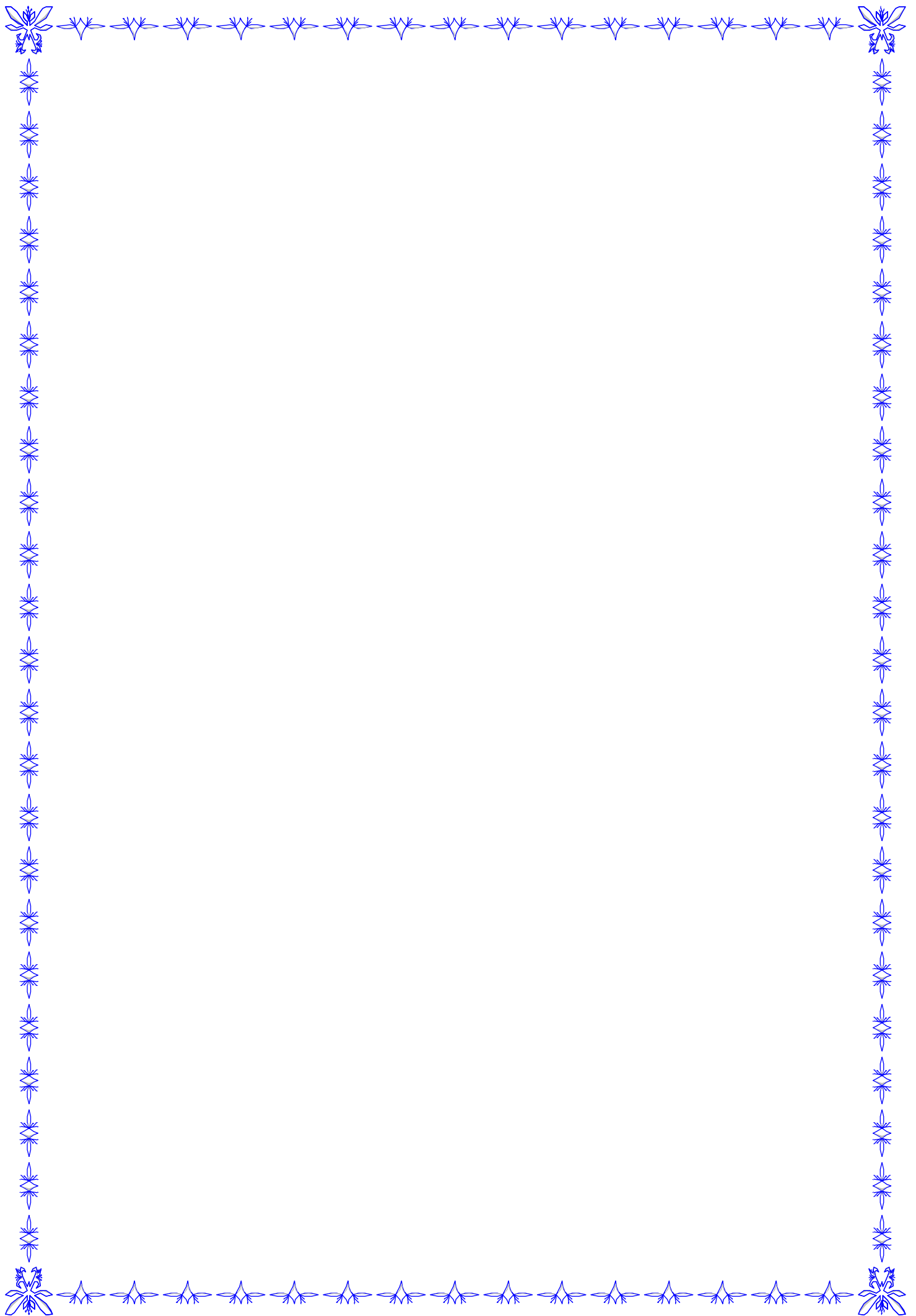
## ملخص

يهدف العمل الحالي إلى دراسة سمية ثنائي الفينيل أ؛ مادة تستخدم بشكل مكثف في صناعة البلاستيك؛ وتأثيرها على بعض مؤشرات الوظيفة الكبدية، الكلوية والتكاثرية عند الجرذ. كذلك لاختبار تأثير المكملات الغذائية السيلينيوم والفيتامين ه ضد التسمم الخلوي الناجم عن التعرض لهذه المادة. قسمت 32 من ذكور الجرذان إلى أربع مجموعات حيث احتوت المجموعة الواحدة على 08 جرذان. وقد تلقت المجموعة الشاهدة زيت الزيتون عن طريق الفم وتحصلت على غذاء عادي. المجموعة الثانية تلقت زيت الزيتون عن طريق الفم وتحصلت على غذاء مضاف إليه السيلينيوم (0.5 ملغ/كلغ وزن الأكل) والفيتامين ه (100 ملغ/كلغ وزن الأكل). المجموعة الثالثة تلقت جرعة 10 ملغ/كلغ/و.ج من ثنائي الفينيل أ مذاب في زيت الزيتون عن طريق الفم وتحصلت على غذاء عادي. بينما تلقت المجموعة الرابعة كل من جرعة 10 ملغ/كلغ/و.ج من ثنائي الفينيل أ مذاب في زيت الزيتون عن طريق الفم وتحصلت على غذاء مضاف إليه السيلينيوم والفيتامين ه لمدة ثلاث أسابيع متتالية.

النتائج المتحصل عليها؛ عقب إعطاء ثنائي الفينيل أ لمدة 03 أسابيع؛ تظهر أنه مسبب زيادة النمو الجسمي عند الفئران المعالجة بهذا المكون. وقد أظهرت النتائج أيضا أن ثنائي الفينيل أ تسبب في اختلال المعايير البيو كيميائية (السكر، البيليروبين، الكوليسترول الكلي، ثلاثي الغليسريد، البروتين الدهني عالي الكثافة (الكوليسترول الجيد)، ألومين، اليوريا، الكرياتينين) والهرمونية (LH والتستوستيرون). أيضا كثافة انتاج الشوارد الحرة المشتقة من الأوكسجين (ROS) مؤدية الى زيادة تأكسد الدهون (ارتفاع تركيز MDA) وانخفاض شديد في تركيز (GSH) على مستوى الكبد، الكلية و الخصيتين. بالإضافة الى ذلك، انخفاض في النشاط الإنزيمي لكل من (CAT، GST،GPX) تم تسجيله عند المجموعة المعالجة بثنائي الفينيل أ مقارنة بالمجموعة الشاهدة.

هذه الاختلالات البيو كيميائية تم تأكيدها بالمعطيات النسيجية المتحصل عليها. إضافة السيلينيوم والفيتامين ه أعطى حماية ضد السمية المسببة من طرف ثنائي الفينيل أ والتي تقوم على محاصرة الشوارد الحرة.

**الكلمات المفتاحية:** ثنائي الفينيل أ، السمية الخلوية، السيلينيوم، فيتامين ه، فأر، التوازن الأيضي.



<b>Liste des figures :</b>	
<b>Figure 1.</b> Réaction de formation du BPA.	<b>03</b>
<b>Figure 2.</b> Chaîne macromoléculaire principale des plastiques polycarbonates.	<b>06</b>
<b>Figure 3.</b> Secteurs d'utilisation des polycarbonates en 2010.	<b>06</b>
<b>Figure 4.</b> Production et consommation de polycarbonates en EU.	<b>07</b>
<b>Figure 5.</b> Chaîne macromoléculaire principale du DGEBPA.	<b>07</b>
<b>Figure 6.</b> Répartition des utilisations du DGEBPA en 2009.	<b>08</b>
<b>Figure 7.</b> Structures chimiques du BPA, du bis-GMA, du bis-DMA et du BPA diglycidyléther (BADGE).	<b>12</b>
<b>Figure 8.</b> Différentes voies d'exposition au bisphénol A.	<b>13</b>
<b>Figure 9.</b> L'action anti-androgénique du bisphénol A.	<b>14</b>
<b>Figure 10.</b> modèle proposé montrant le processus par lequel le BPA stimule la prolifération des cellules JKT-1.	<b>15</b>
<b>Figure 11.</b> Schéma de métabolisation du bisphénol A	<b>17</b>
<b>Figure 12.</b> Altérations métaboliques du bisphénol A.	<b>20</b>
<b>Figure 13.</b> Voie métabolique de l'oxygène et des EROs.	<b>25</b>
<b>Figure 14.</b> Conséquences pathogènes du stress oxydant.	<b>26</b>
<b>Figure 15.</b> Les principales défenses antioxydantes endogènes et exogènes dans la cellule.	<b>27</b>
<b>Figure 16.</b> Rôles anti-stress des hèmes oxygénases (HO-1).	<b>30</b>
<b>Figure 17.</b> Structure chimique des tocophérols et des tocotriénols.	<b>32</b>
<b>Figure 18.</b> La réaction antioxydante de l' $\alpha$ -tocophérol lors de l'auto-oxydation des lipides insaturés.	<b>35</b>
<b>Figure 19.</b> Rôles antioxydants de l' $\alpha$ tocophérol en synergie avec les autres systèmes	<b>36</b>

antioxydants.	42
<b>Figure 20.</b> Répartition du sélénium utilisé dans les différents secteurs en 2009.	49
<b>Figure 21.</b> Schéma récapitulatif du protocole experimental.	56
<b>Figure 22.</b> Gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.	64
<b>Figure 23.</b> Évolution Pondérale (g) chez les rats de différents groupes durant la période d'expérimentation.	
<b>Figure 24.</b> Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline et l'éosine au niveau du foie des rats de différents groupes.	76
<b>Figure 25.</b> Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline et l'éosine au niveau du rein des rats de différents groupes.	81
<b>Figure 26.</b> Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline et l'éosine au niveau du rein des rats de différents groupes.	88

<b>Liste des tableaux :</b>	
<b>Tableau 1.</b> Propriétés physico-chimiques du bisphénol A.	<b>4</b>
<b>Tableau 2.</b> Consommation du BPA en Europe (2005/2006).	<b>5</b>
<b>Tableau 3.</b> Estimations globales de l'exposition journalière des enfants d'un an et plus et des adultes ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c. par jour).	<b>9</b>
<b>Tableau 4.</b> Estimation des concentrations d'exposition inhalatrice ou cutanées du BPA .	<b>11</b>
<b>Tableau 5.</b> NOAEL et doses journalières acceptables (DJA).	<b>19</b>
<b>Tableau 6.</b> DL50/CL50 du bisphénol A.	<b>20</b>
<b>Tableau 7.</b> Principales espèces réactives oxydantes (ERO) et azotés.	<b>24</b>
<b>Tableau 8.</b> La teneur en tocophérol et en tocotriénol dans les céréales.	<b>33</b>
<b>Tableau 9.</b> La teneur en tocophérol et en tocotriénol dans les huiles.	<b>34</b>
<b>Tableau 10.</b> Les besoins quotidiens en Sélénium .	<b>41</b>
<b>Tableau 11.</b> La teneur en Sélénium dans quelques aliments.	<b>41</b>
<b>Tableau 12.</b> Valeur Toxicologique de Référence pour le sélénium.	<b>46</b>
<b>Tableau 13.</b> Variation corporelle, rapports organo-corporels et la prise alimentaire chez les rats de différents groupes.	<b>63</b>
<b>Tableau 14.</b> Variation du poids absolu (P.A) (g) et relatif (P.R) (g/100g de PC) du foie, reins, testicules et cerveau chez les rats de différents groupes.	<b>64</b>
<b>Tableau 15.</b> Variation de taux de quelques paramètres hématologiques chez les rats de différents groupes.	<b>67</b>
<b>Tableau 16.</b> Variation de quelques paramètres biochimiques de la fonction hépatique chez les rats de différents groupes.	<b>70</b>
<b>Tableau 17.</b> Variation du taux du MDA (nmol/mg prot), GSH (nmol/mg prot) et de l'activité de quelques enzymes antioxydantes au niveau du foie des rats de différents groupes.	<b>71</b>
<b>Tableau 18.</b> Comptage semi quantitatif des modifications histo-structurales au niveau	<b>72</b>

du foie des rats de différents groupes.	
<b>Tableau 19.</b> Variation de la concentration de l'urée (g/l) et de la créatinine (mg/dl) chez les rats de différents groupes.	<b>77</b>
<b>Tableau 20.</b> Variation du taux du MDA (nmol/mg prot), GSH (nmol/mg prot) et de l'activité de quelques enzymes antioxydantes au niveau des reins des rats de différents groupes.	<b>78</b>
<b>Tableau 21.</b> Comptage semi quantitatif des modifications histo-structurales au niveau du rein des rats de différents groupes.	<b>78</b>
<b>Tableau 22.</b> Variation du profil hormonal sexuel chez les rats des différents groupes.	<b>82</b>
<b>Tableau 23.</b> Variation de taux du MDA (nmol/mg prot), GSH (nmol/mg prot) et de l'activité de quelques enzymes antioxydantes au niveau des testicules des rats de différents groupes.	<b>83</b>
<b>Tableau 24.</b> Comptage semi quantitatif des modifications histo-structurales au niveau du testicule des rats de différents groupes.	<b>84</b>

**Liste des abréviations :**

**AI:** Adequate Intakes (apport adéquate)

**AR :** récepteur des androgènes

**AR N/C :** (AR) NH<sub>2</sub>- et COOH-terminale récepteur d'androgène

**AR-NCoR :** répresseur de récepteurs nucléaires

**AR-SMRT :** médiateur silencieux pour les récepteurs des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes liées au récepteur des androgènes.

**ATSDR :** Agence pour le registre des substances toxiques et des maladies

**BADGE:** bisphenol A diglycidyl ether

**BBC :** bleu brillant de Coomassie

**Bis-GMA :** glycidylmethacrylate de bisphenol A

**Bis-DMA :** diméthacrylate de bisphenol A

**BPA :** bisphénol A

**CAT :** Catalase

**CDNB :** 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene

**CREB :** protéine de liaison de l'élément de réponse de l'AMP-C

**CYP17A1:** Cytochrome P450 17A1 (17 $\alpha$ -hydroxylase)

**DES :** diéthylstilbestrol

**DGEBPA :** diglycidyl ether de bisphénol A

**DJA :** dose journalière admissible

**DRV:** Dietary Reference Values (VNR)

**DTNB :** 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque acide) réactif d'Ellman

**E2 :** estradiol

**EDTA :** acide éthylènediaminetétraacétique

**EOA :** espèces oxygénées actives

**ERs :** récepteurs des estrogènes

**ERO :** espèces réactives oxydantes

**FSH :** hormone stimulatrice des follicules

**GC-MS/MS :** chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

**GPCR :** récepteurs couplés aux protéines G

**GPx** : Glutathione peroxidase

**GSH** : glutathione

**GST** : Glutathione transferase

**3-HSD** : 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

**17-HSD3** : 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenases

**INERIS** : Institut national de l'environnement industriel et des risques de France

**INSL3**: insuline-like 3

**LC-MS/MS** : Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse

**LH** : hormone lutéinisante

**NHANES**: National Health and Nutrition Examination Survey

**NOAEL**: No Observable Adverse Effect Level

**MDA** : malondialdéhyde

**PBR**: peripheral benzodiazepin receptors)

**PC** : polycarbonates

**PKA**: protéine kinase A

**PKG**: protéine kinase G

**pRb** : protéine rétinoblastome

**PVC**: polyvinyle carbonates

**r/m/h FeTA**: rat/mouse/human Fetal Testis Assay

**ROS**: Reactive Oxygen Species

**Se**: Sélénium

**SVHC**: Super Very High Concern

**StAR**: steroidogenic acute regulatory protein

**TBA**: Tetrabutylammonium hydroxide

**TCA**: acide trichloroacétique

**TEGDMA**: diméthacrylate de triéthylèneglycol

**$\alpha$ -TTP** :  $\alpha$ -tocophérol transfer protein

**UDMA** : diméthacrylate d'uréthane

**UGT** : la famille d'UDP-glycosyltransferase

**UGT2B1** : UDP-glucuronosyl transférase

**UGT2B15** : UDP-glucuronosyl transferase

**Vit E**: vitamine E

**VHC**: Very High Concern

**VLDL**: Very Low Density Lipoprotein

**VNR-B** : Valeur Nutritionnelle de Référence

**US EPA** : Agence de protection de l'environnement des Etas unies.

<i>Table des matières :</i>	
<b>Résumé</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>ملخص</b>	
<b>liste des figures</b>	
<b>liste des tableaux</b>	
<b>liste des abréviations</b>	
<b>Introduction générale</b>	<b>01</b>
<b>Chapitre I. Bisphénol A</b>	
1.1. Qu'est-ce que le bisphénol A ?	<b>03</b>
1.2. Structure et propriétés physico-chimiques	<b>03</b>
1.3. Production du plastique et utilisation du bisphénol A	<b>04</b>
1.4. Voies d'exposition au bisphénol A	<b>08</b>
1.4.1. Voie d'ingestion alimentaire	<b>08</b>
1.4.2. Voie cutanée ou inhalatrice	<b>10</b>
1.4.3. Voie sublinguale	<b>11</b>
1.5. Mode d'action du bisphénol A	<b>13</b>
1.6. Toxicocinétique du BPA	<b>15</b>
1.7. Toxicodynamie du BPA	<b>18</b>
1.7.1 Effet sur la reproduction	<b>20</b>
1.7.2. Les autres effets	<b>23</b>
<b>Chapitre II. Stress oxydatif</b>	
2.1. Présentation des notions d'espèces réactives oxydantes	<b>24</b>
2.2. Surproduction des ROS et le stress oxydant	<b>25</b>
2.3. Système antioxydant de l'organisme	<b>26</b>
2.3.1. Système endogène	<b>27</b>
2.3.1.1. Antioxydants enzymatiques	<b>27</b>
A/ Superoxyde dismutase (SOD)	<b>28</b>
B/ Glutathion peroxydase (GPx)	<b>28</b>

C/ Catalase (CAT)	29
D/ Glutathion S-transférase (GST)	29
E/ Hème oxygénase	29
2.3.1.2. Antioxydants non-enzymatiques	30
A/ Glutathion	30
B/ Métallo-thionines	31
2.3.2. Système exogène	31
2.3.2.1. Vitamine E	32
A/ Propriétés physico-chimique	32
B/ Biosynthèse	32
C/ Sources alimentaires	33
D/ Activités biologiques	34
E/ Métabolisme	37
F/ Carence en vitamine E et hypervitaminose	37
2.3.2.2. Sélénium	39
A/ Propriétés physicochimiques	39
B/ Disponibilité et sources alimentaires	40
C/ Utilisations	42
D/ Activités biologiques	43
E/ Métabolisme	44
F/ Déficit et intoxication en sélénium	45
<b>Chapitre III. Matériels et Méthodes</b>	
3.1. Produit chimique utilisé	47
3.2. Matériel biologique et traitement	47
3.3. Protocole expérimentale	48
3.4. Méthodes d'analyses	50
3.4.1. Paramètres hématologiques	50
3.4.2. Paramètres biochimiques	50
3.4.2.1. Exploration de la fonction hépatique	50
3.4.2.2. Exploration de la fonction rénale	53
3.4.4.1. Exploration de la fonction thyroïdienne	53

3.4.4.2. Exploration de la fonction reproductrice	<b>54</b>
3.4.4. Paramètres du stress oxydant :	<b>55</b>
3.4.4.1. Préparation de l'homogénat	<b>55</b>
3.4.4.2. Dosage des protéines totales	<b>55</b>
3.4.4.3. Principe de dosage du taux de malondialdéhyde(MDA)	<b>56</b>
3.4.4.4. Principe de dosage du taux du glutathion réduit (GSH)	<b>57</b>
3.4.5.5. Principe de dosage de l'activité enzymatique	<b>58</b>
A/ Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)	<b>58</b>
B/ Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST)	<b>59</b>
C/ Dosage de l'activité de la catalase (CAT)	<b>60</b>
3.4.6. Technique Histologique	<b>61</b>
3.7. Analyse Statistique	<b>62</b>
<b>Chapitre VI. Résultats et discussions</b>	
4.1. Impact du bisphénol A sur quelques paramètres physiologiques : effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et en vitamine E	<b>63</b>
4.2. Impact du bisphénol A sur les paramètres hématologiques : effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et en vitamine E	<b>67</b>
4.3. Hépatotoxicité induite par le bisphénol A: effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et en vitamine E	<b>69</b>
4.4. Néphrotoxicité induite par le bisphénol A: effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et en vitamine E	<b>77</b>
4.5. Reprorotoxicité induite par le bisphénol A: effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et en vitamine E	<b>82</b>
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>89</b>
<b>Références</b>	<b>91</b>
<b>Annexes</b>	<b>114</b>



# *Introduction*

## **Introduction générale :**

Malgré leurs applications positives dans divers usages, les produits de la plasturgie peuvent poser de sérieux problèmes vis-à-vis de l'environnement et de la santé. En effet, la contenance des additifs, adjuvants et des monomères, en quantité plus au moins grande dans les polymères, présente le risque de réactions chimiques nocives pendant leur fabrication et leur usage.

Depuis une vingtaine d'années, l'inquiétude de l'innocuité des matières plastiques ainsi les résines époxydes contenant du bisphénol A surtout ceux en contact avec notre nourriture suscite un intérêt croissant au sein de la communauté scientifique et dans la population. Malgré la fixation de la dose journalière admissible (DJA) par les agences réglementaires (*EFSA., 2008 et FDA., 2010*), des études expérimentales réalisées chez les rongeurs ont mis en évidence la toxicité du BPA pour de faibles expositions quotidiennes, inférieures aux doses seuils jusqu'alors jugées sans effet pour l'homme (*Rubin et al., 2001 ; Benachour et Garis., 2009*). Le potentiel perturbateur endocrinien du BPA est alors mis depuis la conférence de Chapel Hill aux Etats-Unis (*Vom Saal et al., 2007*) au cours de laquelle 38 scientifiques ont conclu à un lien possible entre les troubles de la reproduction observés et une exposition de la population humaine au BPA.

Le bisphénol A est considéré alors parmi les perturbateurs endocriniens œstrogénomimétiques (*Richter et al., 2007*). Cette molécule d'intérêt de notre projet de fin d'étude appartient à la famille des diphenyl-alcanes hydroxylés. Une fois, le BPA a été utilisé en tant qu'une hormone synthétique pour prévenir chez la femme les fausses couches et les menaces d'accouchements prématurés (*Dodds., 1936*). Après, il est devenu plus important pour l'industrie du plastique en faisant réagir le BPA et un phosgène ( $\text{COCl}_2$ ) pour obtenir un plastique plus rigide, plus résistant, léger et économique ; d'où la notion du polycarbonate est créée (*Caliendo., 2012*). En effet, le BPA est omniprésent dans nos usages quotidiens à cause de l'utilisation continue de ces produits en polycarbonates : bouteilles réutilisables, gobelets, ustensiles de cuisine jetables, téléphone portable et même dans les dispositifs médicaux...etc.). Ainsi, sa présence dans des résines époxydiques utilisés dans les emballages alimentaires et les scellements dentaires (*Vandenberg et al., 2012*).

À cet égard, nous avons suivi un protocole expérimental qui consiste à évaluer les effets de ce xéno-œstrogène ainsi qu'une approche est mise en évidence pour évaluer l'effet protecteur de deux suppléments alimentaires ; sélénium et vitamine E. Ces deux molécules

non enzymatiques sont partout dans notre régime alimentaire ainsi sous forme des suppléments médicamenteux. En outre, elles possèdent des propriétés biologiques et antioxydantes ce qui les rendent indispensable pour la majorité des processus métaboliques et pour prévenir la peroxydation lipidique. Des études menées à l'échelle nationale (*Messarah et al., 2012 ; 2013 ; Gueroui et al., 2016*) et internationale (*Lee., 2010 ; El-Demerdash., 2004 ; Helal et al., 2016*) ont montré que la vitamine E et le sélénium ont amélioré la perturbation métabolique ainsi la réparation des dégâts causés par les radicaux libres générés par différents polluants.

L'objectif de notre étude consiste à :

- Analyser les effets du bisphénol A, administré aux rats par gavage à raison de 10mg/kg/p.c., sur la variation des paramètres physiologiques, hématologiques et biochimiques ainsi que sur le statut oxydatif au niveau de quelques tissus mous notamment le foie, les reins, les testicules et le cerveau chez le rat de la souche wistar.
- Tester le pouvoir correcteur de la supplémentation en sélénium (0.5mg/kg aliment) en vitamine E (100mg/kg aliment) sur l'hépatotoxicité et le néphrotoxicité ainsi la reprotoxicité induite par le bisphénol A.

Au vu de ces données, notre étude est produite dans différentes parties. Nous allons présenter dans une première partie bibliographique qui contient deux chapitres :

**Le premier chapitre** est consacré sur le bisphénol A, son mode d'action et ses effets sur la santé humaine et animale.

**Le deuxième chapitre** est réservé pour l'étude de stress oxydatif et les différents systèmes de défense antioxydante de l'organisme.

Ainsi, nous allons présenter une deuxième partie expérimentale qui contient elle-même deux chapitres :

**Le troisième chapitre** est consacré pour la partie « matériel et méthodes » et les techniques du dosage des paramètres biochimiques, hématologiques et ceux du stress oxydatif.

**Le quatrième chapitre** est réservé pour la partie résultats obtenus et leurs discussions en faisant ainsi une comparaison aux travaux de recherche antérieurs qui font référence dans le domaine.



*Chapitre II*

## 1. Bisphénol A

### 1.1. Qu'est-ce que le bisphénol A ?

Le bisphénol A (BPA) est une substance d'origine exclusivement anthropique : une substance chimique de nomenclature scientifique 2,2-bis (4-hydroxyphényle) propane qui a été découverte en 1891 par le chimiste Russe *Alexandre Dianin*, mais la première fois annoncé le BPA dans un papier scientifique était en 1905 par *Thomas Zincke* de l'université de *Marburg* ; *Allemand (Caliendo., 2012)*. Le BPA possède une propriété œstrogène-mimétique, dont les premières études ont été réalisées dans les années 1930s où il fut administré à des rates ayant subi une ablation des ovaires afin de prévenir chez la femme les fausses couches et les menaces d'accouchements prématurés (*Takeshita et al., 2001*). Néanmoins, cette perspective d'utilisation clinique a été abandonnée avec la découverte en 1938 du diéthylstilbestrol (DES), une molécule possédant une meilleure affinité pour les ERs et une activité oestrogénique plus importante que le BPA (*Kang et al., 2006*).

Depuis les années 1950s, après la découverte d'un nouveau type de plastique plus rigide par *Dr. Hermann Schnell* et *Dr. Daniel Fox* en faisant réagir le BPA et un phosgène ( $\text{COCl}_2$ ), le BPA est couramment devenu un monomère important dans l'industrie du plastique spécifiquement les polycarbonates et les résines époxydiques (*Caliendo., 2012*).

### 1.2. Structure et propriétés physicochimiques :

Le Bisphénol A (BPA) ; 2,2-bis (4-hydroxyphényle) propane ; est une molécule de petite taille issue de la catalyse acide de deux phénols avec une cétone, dont la structure chimique est présentée par la (*Fig.01*).

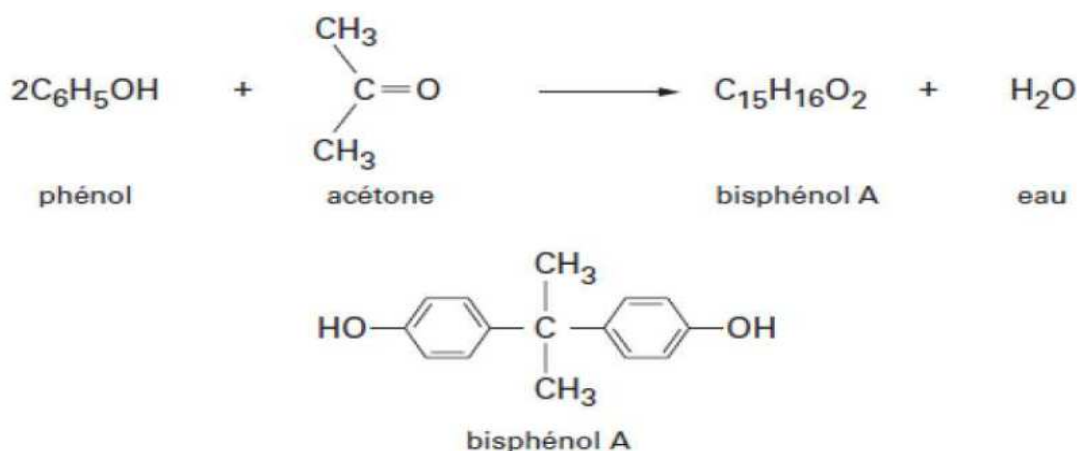


Figure 1. Réaction de formation du BPA (*INERIS., 2010*).

Il est un solide de couleur blanche appartenant à la famille des diphenyl alcanes hydroxylés, ou les bisphénols pouvant se présenter sous forme de poudre, écailles ou cristaux, d'odeur légèrement phénolique avant transformation, peu soluble dans l'eau (120-300mg/l à 25°C), soluble dans l'acide acétique, les solutions aqueuses alcalines et dans certains solvants : acétone, éthanol et méthanol). Le bisphénol A est un hydrophobe et présente une affinité potentielle pour les lipides. Il a une biodégradation rapide en présence d'oxygène dans les sols, l'eau et l'air (INERIS., 2010). Ses propriétés physico-chimiques sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques du bisphénol A (INERIS., 2010).

Propriétés	
Formule chimique brute	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
N°CAS*	80-05-7
Masse molaire	228,3g/mol
Solubilité dans l'eau	120-300mg/l à pH=7
Coefficient de partage octanol/eau/log K <sub>OH</sub>	3,4(2,20-4,16)
Constante d'ionisation pKa)	9,73(9,6-10,2)
Coefficient de répartition (sang/plasma)	0,67-1.1
Pression de vapeur	4,12-10,9 hPa à 25°C
Demi-vie dans l'air	4-5 h
Demi-vie dans l'eau	2,5 – 4 jours
Demi-vie dans les sédiments	300 jours

### 1.3. Production du plastique et utilisation du bisphénol A :

La consommation et la production de matières plastiques n'ont cessé d'augmenter au cours de ces dernières décennies, conduisant à une production de déchets sans cesse progressive (Derraik., 2002 ; Van Cauwenberghe et al., 2013). La production mondiale de plastiques augmente de 5 à 10 % par an. Malgré la crise de 2008 l'industrie du plastique n'a été pas épargnée.

En ce qui concerne le BPA, il est utilisé dans de nombreux secteurs industriels pour ses propriétés d'antioxydant et durcissant. Toutefois, deux utilisations totalisent plus de 97 % de la consommation de BPA en Europe : la fabrication de plastiques polycarbonates et la production de résines époxydes, comme nous le démontre le *tableau 02* ci-dessous, l'industrie

produit plus d'un million de Tonnes de BPA par an, soit environ 0,35 % de la production totale de plastiques. À l'échelle mondiale, la consommation de BPA a amplifié d'un taux annuel moyen de l'ordre de 10 % sur la période allant de 2003 à 2006. On peut expliquer cette hausse de consommation par une forte demande en polycarbonate (*Commission Européenne., 2008*).

Tableau 2. Consommation du BPA en Europe (2005/2006) (*Commission Européenne., 2008*).

Données sur l'utilisation	Tonnes/an	Pourcentage de la consommation (%)
<b>Total de la consommation</b>	1 084 870	100
<b>Polycarbonates (PC)</b>	865 000	79,55
<b>Résines époxydes dont :</b>	196 535	18,08
- Revêtement de canettes	2 755	0,25
<b>Résines phéno-plastiques</b>	8 800	0,81
<b>Polyesters insaturés</b>	3 600	0,33
<b>Papier thermique</b>	1 890	0,17
<b>Polychlorure de Vinyle (PVC) dont :</b>	1800	0,17
-Stabilisant	450	0,04
-Plastifiant	900	0,08
- Antioxydant	450	0,04

Les polycarbonates (PC) et les résines époxydes représentant environ 97,5% de la consommation totale de BPA. Mentionnons toutefois que le BPA est également utilisé dans le PVC. En effet, le BPA s'y retrouve soit comme antioxydant, plastifiant ou comme stabilisant. De manière générale, le bisphénol A présent dans le PVC préserve sa souplesse et renforce sa résistance aux chocs (*Peltier., 2011*). Les polycarbonates sont des plastiques courants utilisés dans la conception d'emballages alimentaires tels que des bouteilles d'eau, des récipients de conservation, des biberons...etc. (*Bonefeld-Jorgensen et al., 2007*).

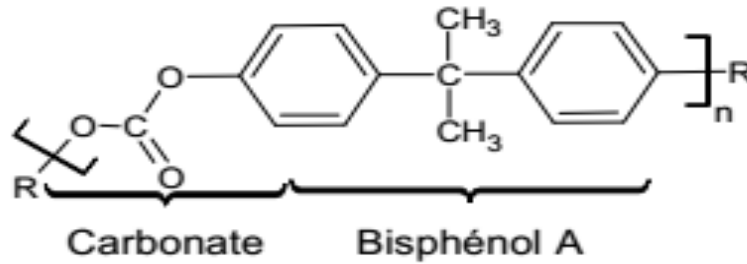


Figure 2. Chaîne macromoléculaire principale des plastiques polycarbonates (Mathieu Cladière., 2012).

On le retrouve également dans la conception de plastiques non alimentaires, principalement dans les verres optiques, en raison de son caractère transparent. Il sera également présent en concentration plus ou moins élevée dans les carrosseries automobiles, les CDs, des DVDs...etc. Tous ces usages sont justifiés par les caractéristiques des polycarbonates, comme la clarté, ou encore la résistance à la chaleur et aux chocs (INERIS., 2010). Ainsi, les secteurs d'utilisation des polycarbonates sont présentés dans la Figure 03 ci-dessous.

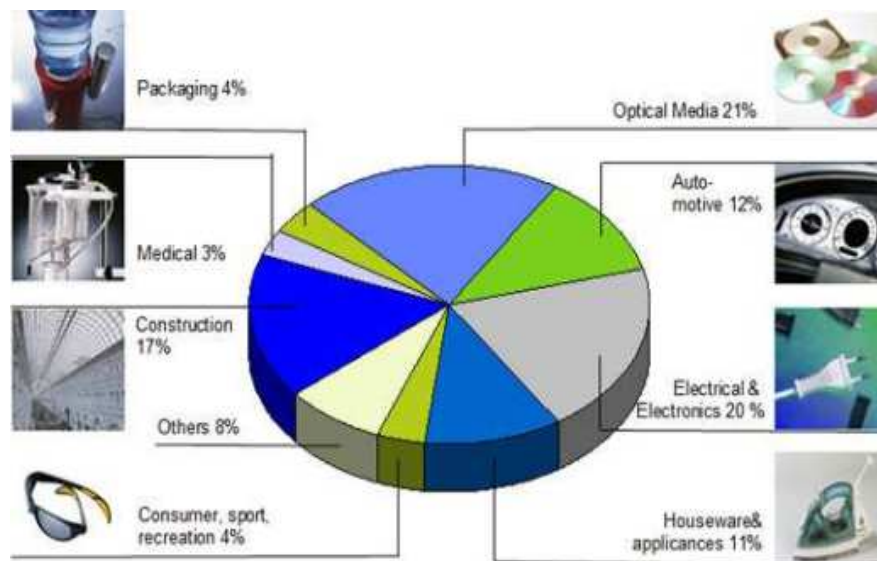


Figure 3. Secteurs d'utilisation des polycarbonates en 2010 (Mathieu Cladière, 2012).

En Europe, la production et la consommation de PC varient fortement en fonction des États membres considérés (Fig.04). Ainsi, la Belgique produit 22 % de la production totale européenne de polycarbonate mais n'en consomme que 3 %. Inversement, des pays comme le

Royaume Uni et l'Italie n'en produisent pas mais consomment respectivement 12 et 13 % de la consommation totale européenne (Mathieu Cladière., 2012).

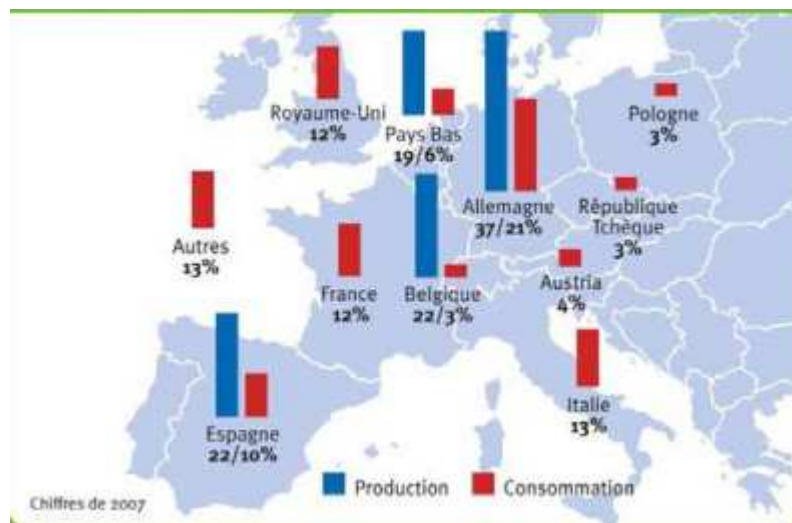


Figure 4. Production et consommation de polycarbonates en EU (Fédération de la Plasturgie., 2011) La 1ère colonne (bleu) nous renseigne sur les productions de PC tandis que la 2ème colonne (rouge) nous renseigne sur la consommation de PC.

Les résines époxydes représentent 18 % de l'utilisation totale du bisphénol A. Le diglycidyl ether de bisphénol A (DGEBA) est la résine époxyde la plus utilisée à travers le monde (95 % de la consommation) en raison de son prix relativement faible et de son adéquation à de nombreuses utilisations (Pham et Marks., 2004). En 2000, le marché mondial des résines époxydes est estimé à environ 1,15 millions de tonnes, dont plus de 30 % sont attribués à l'Union européenne, avec plus de 370000 tonnes (Pham et Marks., 2004 ; INERIS., 2010).

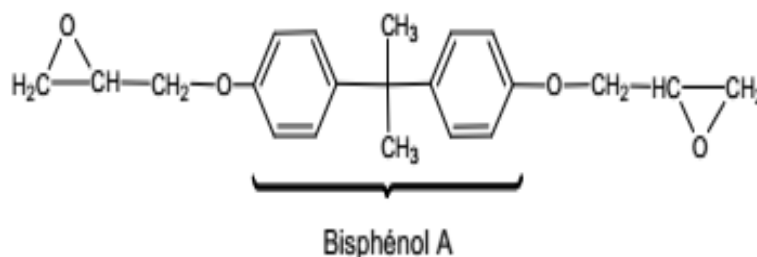


Figure 5. Chaîne macromoléculaire principale du DGEBA (Mathieu Cladière., 2012).

Selon Plastics Europe, les résines époxydes sont utilisées pour leur capacité de protection contre la corrosion et leur stabilité thermique, majoritairement : elles sont utilisées comme durcisseurs, présents dans certaines peintures ou encore dans les colles (colle époxy

couramment utilisée par les bricoleurs). Ces résines ont de multiples usages, notamment dans le domaine de la construction (revêtement de sol), l'alimentation (revêtement interne des canettes), ou encore les loisirs (instruments de musique, skis...). On retrouve également du BPA dans les tickets de caisse, les emballages alimentaires ou encore les ciments dentaires (INERIS., 2010). Ainsi, les secteurs d'utilisation des résines époxydes sont présentés dans la Figure 06 ci-après.

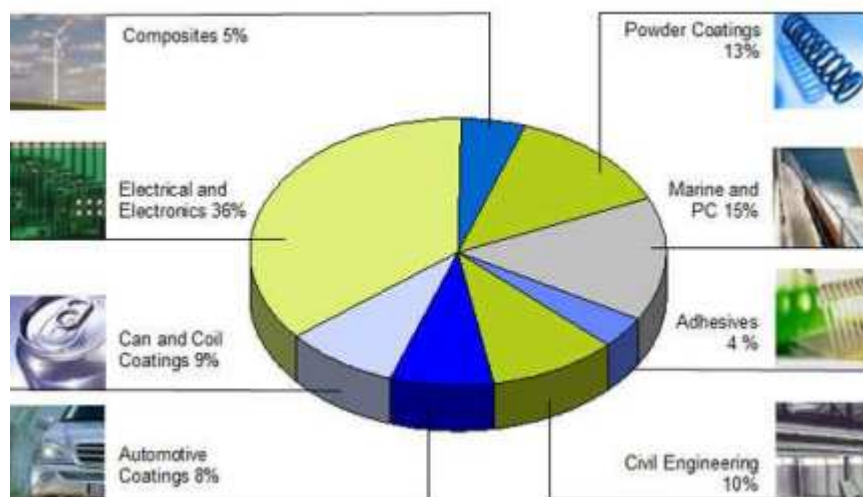


Figure 6. Répartition des utilisations du DGE BPA en 2009 (Mathieu Cladière, 2012).

### 1.4. Voies d'exposition au bisphénol A :

Les fenêtres d'exposition au BPA sont diverses avec des expositions continues depuis la gestation se poursuivant à l'âge adulte et dans les générations suivantes ou des expositions limitées à une période précise du développement par exemple pendant la période gestationnelle, néonatale, pré-pubertaire, post-pubertaire... Largement présent dans notre environnement quotidien, le bisphénol A (BPA) se retrouve dans le sang et l'urine de la quasi-totalité des populations occidentales. Bien que rapidement éliminé, le BPA est présent à niveau constant dans l'organisme du fait de l'exposition continue (EFSA., 2006).

#### 1.4.1. Voie d'ingestion alimentaire :

La principale voie d'exposition évoquée est l'alimentation mais peut-être d'autres voies ne sont-elles pas à négliger (EFSA., 2006 et 2008 ; NTP-CERHR., 2008).

Environnement Canada estime que l'exposition de la population au BPA varie de 0,08 à 4,30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c. par jour (Tab.03). D'autres sources indiquent une consommation qui varie de

0,028 à 0,18 µg/kg p.c. par jour chez les bébés, de 0,04 à 14,7 chez les enfants et de 0,36 à 0,43 chez les adultes. Dans la mesure où le BPA est un monomère des polymères plastiques utilisés pour emballer ou contenir les aliments, cette exposition relève d'une part des monomères résiduels de BPA présents dans ces matériaux et susceptibles de migrer dans l'aliment, et d'autre part du BPA qui peut être libéré par l'hydrolyse du polymère, en particulier au cours du chauffage, comme cela peut se produire pour les biberons en polycarbonate par exemple. Cette migration est d'autant plus importante que le polycarbonate a été utilisé à de nombreuses reprises ou qu'il est au contact de solutions alcalines (EFSA., 2006 ; Lim et al., 2009).

**Tableau 3. Estimations globales de l'exposition journalière des enfants de 1 an et plus et des adultes (µg/kg p.c. par jour) (environnement Canada., 2008)**

Groupe d'âge	Absorption attribuable à la consommation d'aliments en conserve <sup>1</sup>		Absorption attribuable à la migration à partir de bouteilles en polycarbonate <sup>2</sup>	Absorption globale à partir des milieux naturels <sup>3</sup>		Absorption totale estimée	
	moyenne	maximale	Moyenne	moyenne	maximale	moyenne	maximale
<b>1- 4 ans</b>	0,25	1,98	0,012	0,012	0,28	0,27	2,27
<b>5 -11 ans</b>	0,15	1,28	0,010	0,005	0,16	0,17	1,45
<b>12-19 ans</b>	0,09	0,73	0,005	0,001	0,06	0,10	0,80
<b>Adultes</b>	0,07	0,60	0,006	0,001	0,06	0,08	0,67

<sup>1</sup>Les valeurs sont fondées sur les concentrations moyennes et maximales de bisphénol A mesurées dans les aliments en conserve.

<sup>2</sup>La valeur est fondée sur la concentration moyenne de bisphénol A mesurée dans l'eau, soit 0,24 ppb, par suite de l'utilisation de bouteilles de polycarbonate à la température ambiante.

<sup>3</sup>Les valeurs sont fondées sur les concentrations moyennes et maximales de bisphénol A mesurées dans divers milieux naturels.

Dans des conditions normales d'utilisation d'un biberon, cette migration est de quelques µg/l d'eau ou de lait. Chez les adultes, la consommation de boissons contenues dans des bouteilles en polycarbonates d'aliments en conserve ou de denrées chauffées à la micro-onde dans leur emballage plastique se traduit par des valeurs d'exposition moyennes voisines de 0,033 µg/kg p.c./ j (Lim et al., 2009). Alors qu'elles sont environ 25 fois plus élevées pour le

nourrisson nourri au biberon en polycarbonate soit 0,800 µg/kg/j. Cette dose est très inférieure à la dose journalière admissible pour l'homme (50 µg/kg/j) mais compatible avec des expositions étudiées chez l'animal (EFSA., 2006 ; Vandenberg et al.. 2007a).

### 1.4.2. Voie cutanée ou inhalatrice :

Les autres modalités d'exposition telles que celles provenant de la manipulation de papiers thermosensibles ou encore l'inhalation de poussières contaminées par du BPA sont peu documentées et sont considérées comme négligeables pour le consommateur (EFSA., 2006).

En ce qui concerne ce deuxième point, peu de données existent sur l'absorption par inhalation ainsi que sur les niveaux de contamination de l'air. Toutefois, des travaux récents indiquent que les poussières domestiques peuvent contenir plus de 15 000 µg/kg de BPA et que cette valeur peut être 5 fois plus élevée pour des poussières collectées dans des bureaux (Völkel et al., 2008). Par ailleurs, les calculs d'estimation de l'absorption cutanée du BPA font mention d'une valeur de 10 % de la dose appliquée (EFSA., 2006), ce que semble confirmer les travaux de Kaddar et son équipe à partir d'un modèle de peau de porc (Kaddar., 2008).

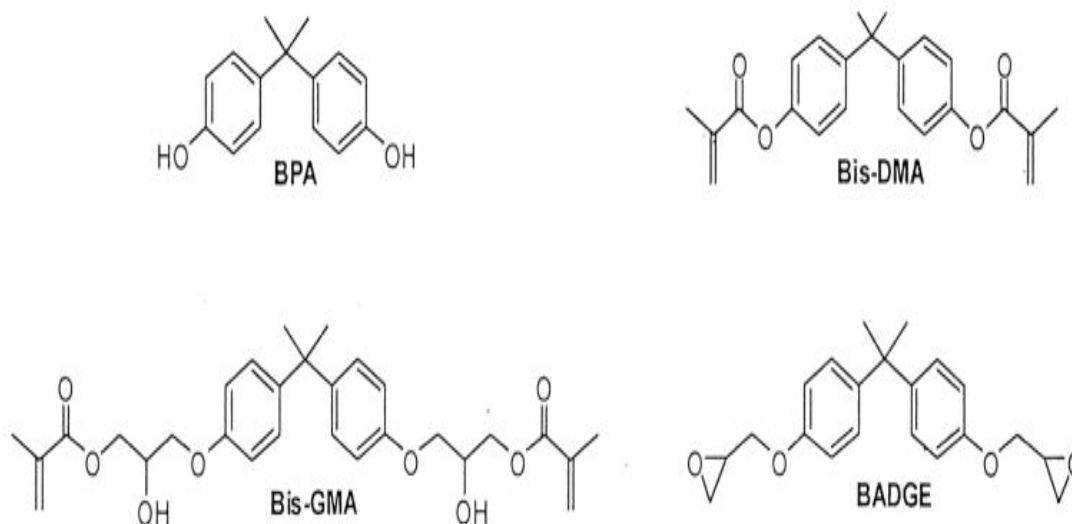
Le tableau 04 résume les estimations de l'exposition professionnelle au BPA par l'EPA chez les travailleurs dans le domaine de la plasturgie. Ça nous montre que la voie dermique est plus importante que les produits entre en contact avec la peau des travailleurs lors de leur production et leur transport. Cependant, la dose inhalatrice des résines époxy est un peu élevée que les polycarbonates et les flammes (0-28mg/jr).

Tableau 4. Estimation des concentrations d'exposition inhalatrice ou cutanées du BPA (EPA., 2010).

Stade	Type d'exposition	Dose du BPA (mg/jr)
<b>Industriel</b>	Inhalation	0-9.6
	Cutanée (liquide/solide)	882-3.100
<b>Polycarbonates</b>	Inhalation	0.7-2.7
	Cutanée (solide)	0.31-3.100
<b>Résines époxy</b>	Inhalation	0-28
	Cutanée (solide)	3.100
<b>Flames retardantes</b>	Inhalation	0
	Cutanée (solide)	3.100

### 1.4.3. Voie sublinguale :

Le BPA peut être trouvé comme impureté dans les résines dentaires mais n'est pas utilisé dans leur formulation car l'humidité de la salive inhibe sa polymérisation en provoquant l'hydrolyse des 2 groupes hydroxyles terminaux. Ainsi, le diméthacrylate de glycidyle de BPA (bis-GMA), le dérivé le plus fréquemment utilisé comme base de la résine, comporte des groupes méthacrylate de méthyle ajouté aux groupes hydroxyle du BPA via un espaceur glycidylique. D'autres monomères tels que le diméthacrylate de triéthylèneglycol (TEGDMA) et le diméthacrylate d'uréthane (UDMA) sont fréquemment ajoutés à la résine pour maximiser la viscosité (Soderholm et al., 1999).



**Figure 7. Structures chimiques du BPA, du bis-GMA, du bis-DMA et du BPA diglycidyléther (BADGE) (Soderholm et al., 1999).**

Joskow et ces collègues ont pu mesurer les concentrations en BPA dans la salive et dans l'urine de 14 patients ayant reçu des scellements dentaires de différente nature. Les concentrations moyennes mesurées dans la salive étaient respectivement de 0,54 et 42,8  $\mu\text{g/l}$ , alors que les concentrations urinaires maximales étaient observées une heure après l'application et correspondaient respectivement à 7,26 et 27,3  $\mu\text{g/l}$ , de 2 à 10 fois supérieurs aux taux moyens habituellement observés (Joskow et al., 2006).

Bien que le BPA pur ne soit pas un composant de la résine dentaire, il a été détecté dans la salive après la mise en place de la résine à la suite de l'hydrolyse du bis-DMA par les estérases salivaires. Bien qu'il ait été démontré que le bis-DMA s'hydrolyse en BPA, le bis-GMA ne subit pas cette réaction, probablement parce que sa structure chimique empêche l'hydrolyse au niveau de la liaison ester (Rathee et al., 2012).

D'après une nouvelle étude, la biodisponibilité du BPA qui en résulte par voie sublinguale (70-90%) est très supérieure à sa biodisponibilité par voie digestive (inférieure à 1% dans l'étude). Une équipe française de Toxalim ; une unité de Recherche du Centre INRA de Toulouse ; a montré que le BPA diffuse à travers la muqueuse sublinguale du chien (très vascularisée) et accède directement à la circulation sanguine générale. Les chercheurs ont mis en évidence une absorption directe du BPA dans la cavité buccale qui conduit à des concentrations plasmatiques près de 100 fois supérieures à celles attendues lorsque la même quantité de BPA est absorbée au niveau intestinal (Gayrard et al., 2013).

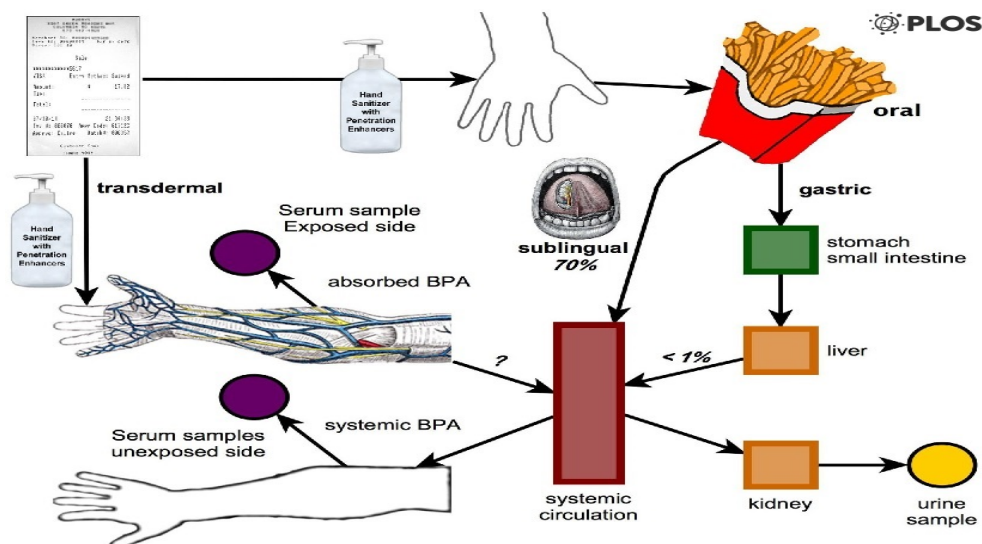


Figure 8. Différentes voies d'exposition au bisphénol A (Hormann et al., 2014).

### 1.5. Mode d'action du bisphénol A :

Il existe en effet des relations bien définies entre les caractéristiques structurales du BPA et son activité biologique. Pour présenter des propriétés œstrogéniques, une molécule doit présenter deux caractéristiques essentielles : un groupement aromatique hydroxyle (cycle phénolique) et un squelette hydrophobe. Le groupement hydroxyle est fondamental pour l'activité hormonale. Le second groupement fonctionnel à base d'oxygène (hydroxyle, cétone, ou carbonyle) lui confère, ou du moins augmente l'activité œstrogénique (Perez et al., 1998).

Le BPA répond à cette règle : il possède deux noyaux phénoliques qui lui permettent de se lier aux récepteurs des œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$  de façon similaire à l'œstradiol mais 10000 fois moins forte que lui. Il active alors une réponse qui a été largement considérée comme la source de ses effets indésirables lors des études animales (Kuiper et al., 1998).

La liaison du BPA à d'autres types de récepteurs nucléaires est l'hypothèse qui peut expliquer ses effets à faibles doses ainsi que ses effets non-monotones. Plusieurs études ont montré que le BPA se liait au récepteur nucléaire des androgènes (AR) (Lee et al., 2003 ; Xu, 2005 ; Li et al., 2010). Contrairement aux ERs, le BPA est un antagoniste pour les ARs et son affinité est de l'ordre de la micro-molaire. L'action anti-androgénique du BPA a été exercée par l'inhibition de l'interaction AR N/C et en renforçant les interactions AR-SMRT et AR-NCoR (Wang et al., 2017). Le SMRT (silencing mediator of retinoic acid thyroid hormone receptor) et le NCoR (nuclear receptor co-repressor) sont deux corépresseurs transcriptionnels

les plus largement caractérisés dans répression de l'AR (Dreer et al., 2016 ; Perissi et al., 2010). D'autre part, les effets observés à faible dose pourraient en partie s'expliquer par des actions synergiques à travers les récepteurs ERs (action agoniste et féminisante) et le récepteur AR (antagoniste de l'effet masculinisant). D'autre part, il est à noter que le BPA a une activité agoniste à faibles concentrations (1 à 10 nano-molaire) sur une forme mutée de l'AR (AR-T877A) associée à des cancers de la prostate résistants aux anti-androgènes (Wetherill et al., 2002 ; 2005). Récemment, il a été montré que le BPA pouvait avoir une action sur les récepteurs ER $\gamma$  in vitro (Abad et al., 2008 ; Li et al., 2010) et in vivo (Tohmé et al., 2014). Ces travaux devraient permettre de mieux comprendre les effets de cette molécule sur le métabolisme, notamment sur le diabète et l'obésité. La liaison à ce récepteur pourrait expliquer les effets du BPA sur les organes non liés à la reproduction tel que le système auditif (Marion., 2016).

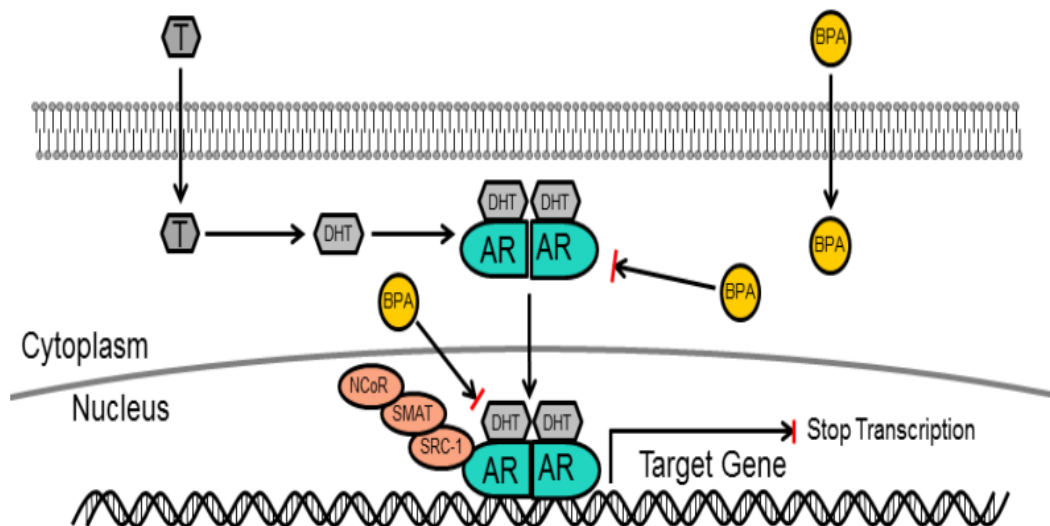


Figure 9. L'action anti-androgénique du bisphénol A

Outre, il est également capable de déclencher un effet non génomique dans les cellules des îlots pancréatiques, endothéliales et hypophysaires et dans les cellules du cancer du sein en initiant des réponses rapides à de faibles concentrations. Bouskine et ses collègues (2009) ont démontré pour la première fois que de très faibles doses de BPA ( $10^{-9}$  à  $10^{-12}$  M) stimulent la prolifération des cellules de séminome humain en permettant une activation rapide et non génomique, initiée par des voies de signalisation de la PKA et de la PKG associées à la phosphorylation du facteur de transcription CREB et le régulateur du cycle cellulaire Rb (Fig.10). Cet effet promoteur, similaire à celui observé avec E2-BSA mais pas avec E2 seul, a été déclenché indépendamment des ER classiques via un récepteur membranaire appartenant à la famille des GPCR.

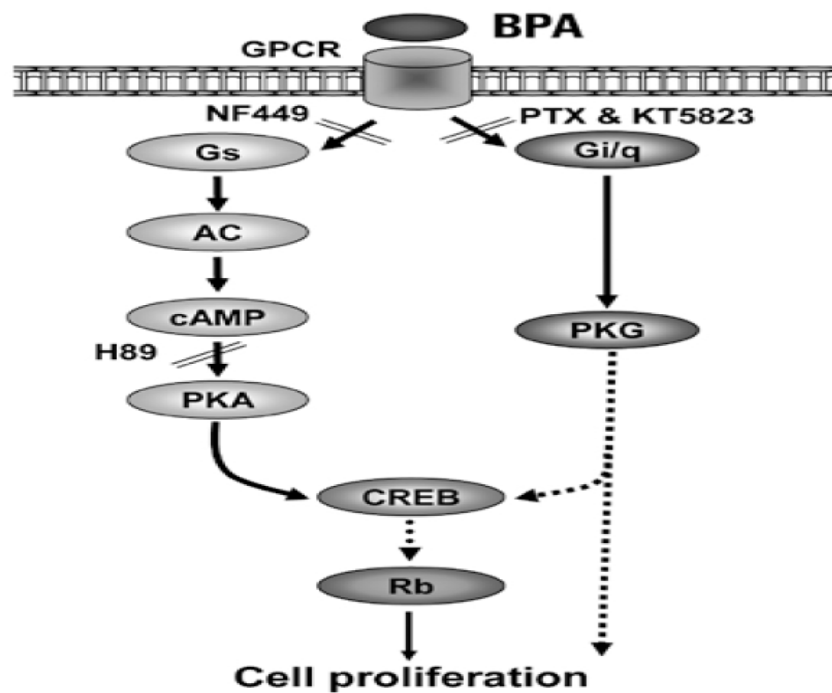


Figure 10. Modèle proposé montrant le processus par lequel le BPA stimule la prolifération des cellules JKT-1 en activant les voies de la PKA et de la PKG via un GPCR non classique (Bouskine et al., 2009). Les lignes continues représentent les étapes démontrées et les lignes en pointillés représentent les voies possibles à démontrer. AC, adénylate cyclase.

D'après les différentes études réalisées, l'activité du BPA varie selon le niveau d'expression des ERs au niveau des tissus. Alors, Il peut manifester des effets agonistes, antagonistes ou des effets mixtes agonistes-antagonistes sur les ERs. De plus, une même dose du BPA ne présente pas la même amplitude d'action biologique au niveau des tissus cibles.

### 1.6. Toxicocinétique du BPA :

Les expérimentations menées chez l'homme adulte montrent que le BPA est totalement absorbé par la voie digestive. Il est ensuite pris en charge par les enzymes de biotransformation intestinales et hépatiques, principalement celles responsables de la conjugaison des xéno-biotiques. Völkel et son équipe (2002) ont administré sous forme de gélule 5000µg dose unique de BPA marqué au deutérium à des volontaires humains des deux sexes. Des prélèvements de sang et d'urine ont été effectués à intervalles réguliers au cours des heures qui ont suivi l'administration et ces échantillons ont fait l'objet d'analyses en GC-MS/MS et LC-MS/MS avant et après hydrolyse à la  $\beta$ -glucuronidase. Les résultats obtenus indiquent que le pic plasmatique est atteint environ 80 minutes après l'ingestion

(concentration=800 nmol/l) et que le BPA circulant est presque exclusivement sous la forme de conjugué à l'acide glucuronique (BPA-glucuronique). Ce dernier est rapidement éliminé dans l'urine et aucun autre métabolite n'a été retrouvé par ces auteurs. Des travaux analogues menés par *Tsukioka* et son équipe (2004) chez un seul individu recevant par voie orale 100 µg de BPA deutéré indiquent une concentration urinaire maximale de 90 µg/l (30 minutes après le traitement). Ces travaux démontrent chez l'homme adulte une élimination rapide et complète du BPA dans l'urine sous forme de BPA-glucuronide, mais ne reflètent pas forcément les conditions d'exposition chronique au BPA de la population générale.

En outre, plusieurs études d'exposition révèlent la présence de BPA libre dans l'urine pour environ 10% des échantillons. En effet, Il ne peut pas être exclu que les traces de BPA libre retrouvées dans l'urine puissent provenir de contaminations au cours de l'analyse elle-même (*Völkel et al., 2008*) ou encore de l'hydrolyse du conjugué après le prélèvement urinaire, libérant de ce fait le composé parent (*Waechter et al., 2007*).

Compte tenu de la demi-vie du BPA de 4-6h et de l'exposition supposée essentiellement alimentaire à cet agent chimique, il devrait être observé une diminution graduelle des niveaux d'excrétion urinaire du BPA et/ou de ses métabolites. D'après *Stahlhut* et ses collègues (2009), un jeûne de 24 h n'a pas d'effet significatif sur les taux d'élimination totale du BPA (libre + conjugué) dans l'urine. En effet, les concentrations médianes observées chez 129 sujets de la cohorte américaine (*NHANES*) sont de 2,6 µg/g<sub>créatinine</sub> pour les prélèvements (0-4-5h) et pour 899 individus de 2,4 µg/g de créatinine pour les prélèvements (8-5-24h) après le début du jeûne. Ces données suggèrent aux auteurs que l'exposition alimentaire n'est pas nécessairement prépondérante, que les cinétiques d'élimination observées pour une dose unique ne sont peut-être pas extrapolables à l'exposition continue, que le BPA pourrait être retenu dans un compartiment tel que le tissu adipeux, ou encore que le BPA urinaire pourrait provenir d'autres contaminants que le BPA (*Stahlhut et al., 2009*).

Des extrapolations des données de pharmacocinétiques de l'animal à l'homme sont rendues délicates en raison d'importantes différences inter-espèces pour ce qui concerne l'existence ou non d'un cycle entéro-hépatique dans le processus d'élimination du BPA conjugué à l'acide glucuronique. En effet, chez le rat ce métabolite est éliminé pour partie dans la bile pour être après hydrolysé dans la lumière intestinale, réabsorbé par la paroi intestinale (*Kurebayashi et al., 2003*). Ce processus n'a pas lieu chez l'homme, ce qui a pour conséquence une élimination urinaire plus rapide. De ce fait, la demi-vie du BPA chez l'homme est de 4 à 6 heures (*Völkel et al., 2002 ; 2005*) et l'élimination est complète en 24

heures, alors que les données chez le rat font état d'une demi-vie comprise entre 24 et 48 heures (Kurebayashi et al., 2003).

En outre, chez le rat c'est majoritairement l'iso-forme 2B1 de l'UDP-glucuronosyl transférase (UGT2B1) qui prend en charge la glucuronidation du BPA (Yokota et al., 1999). Chez l'homme, c'est principalement l'UGT2B15 qui est responsable de cette glucuro-conjugaison (Hanioka et al., 2008). Le polymorphisme génétique de l'UGT2B15 pourrait entraîner d'importantes variabilités interindividuelles en matière de capacité de détoxification du BPA chez l'homme. S'il est vrai que l'expression des UGT est limitée chez le fœtus et pendant les premiers jours de la vie, ces enzymes sont suffisamment actives pour métaboliser de faibles doses de BPA comme le montre l'étude de Calafat et son équipe qui a mis en évidence des glucuro-conjugués du BPA dans les urines de nourrissons prématurés (Calafat et al., 2009).

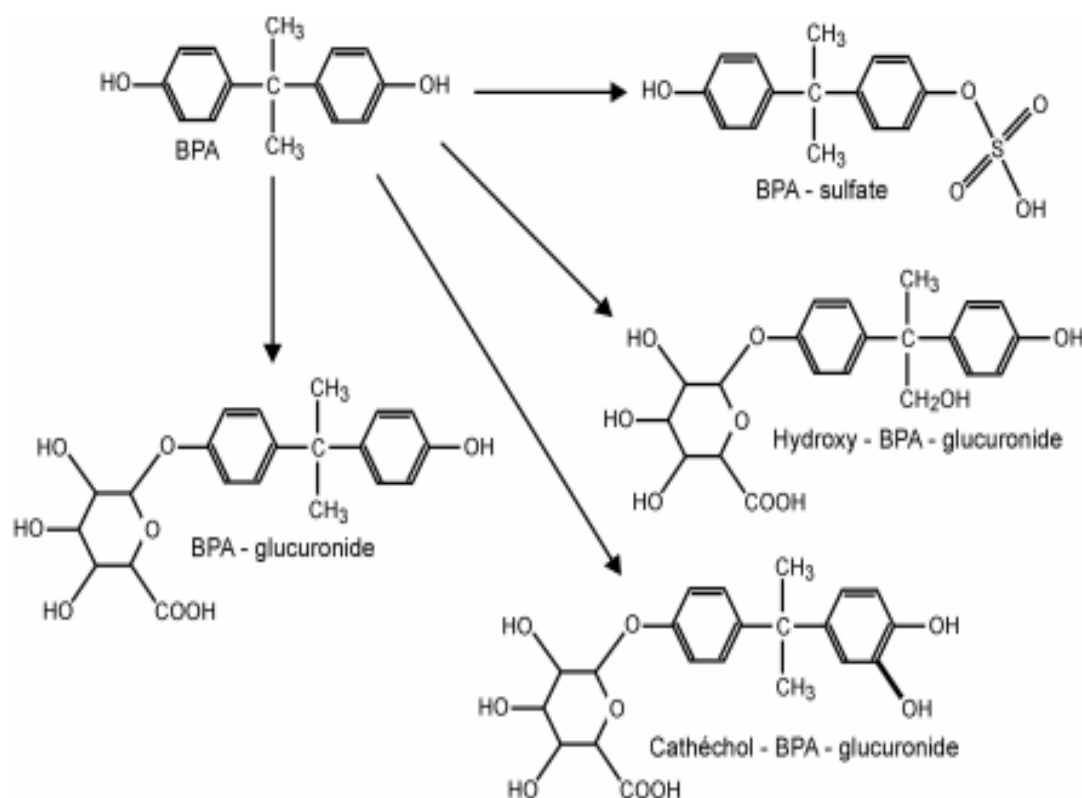


Figure 11. Schéma de métabolisation du bisphénol A (Bursztyka et al., 2008)

Les données recueillies chez l'Homme montrent que le BPA-glucuronide est le métabolite majoritaire puisqu'il représente plus de 90 % de la forme circulante et des métabolites urinaires. Le BPA-sulfate est plus rarement identifié et quantifié. Kim et son équipe (2003)

ont démontré chez des sujets coréens masculins (N=15) et féminins (N=15) que le BPA-sulfate était bien présent. Chez les hommes, les niveaux de BPA sulfate et BPA glucuronide étaient respectivement de  $0,49 \pm 0,27$  et  $2,34 \pm 0,85$   $\mu\text{g/l}$  alors que chez les femmes ces concentrations étaient respectivement de  $1,20 \pm 0,32$  et  $1,0 \pm 0,34$   $\mu\text{g/l}$ . Ces deux formes représentent des voies de détoxication du BPA dans la mesure où elles ne sont pas actives sur les récepteurs aux œstrogènes.

Très récemment, *Nishikawa* et ses collègues (2010) ont montré chez des rates en gestation dont l'utérus a été perfusé par de faibles doses de BPA-glucuronide que la dé-conjugaison de ce métabolite avait bien lieu dans le liquide amniotique et le fœtus, libérant de ce fait du BPA. Tandis, la glucuronidation du BPA représente bien la voie majoritaire chez le rongeur, plusieurs autres métabolites ont néanmoins été identifiés, tels que le BPA di-glucuronide, ou des conjugués méthoxylés (*Zalko et al., 2003*).

### 1.7. Toxicodynamique du BPA

Le BPA a fait l'objet de plusieurs évaluations de risque à la demande de différentes agences sanitaires aussi bien en Europe qu'aux Etats-Unis (Tab.05). Ces évaluations de risque se sont appuyées principalement sur deux études réalisées par Tyl et son équipe (2002 ; 2008) selon les lignes directrices de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). À partir de ces études conduites sur plusieurs générations de rats et souris un NOAEL de 5 000  $\mu\text{g/kg p.c. /j}$  a été établi. Ce NOAEL est établi pour des effets de toxicité systémique. Sur la base de ces travaux, les autorités sanitaires ont défini une dose journalière admissible pour l'Homme de 50  $\mu\text{g/kg/j}$  en Europe.

Tableau 5. NOAEL et doses journalières acceptables (DJA) (Inserm., 2010).

Évaluation de risques	Étude	NOAEL*mg/kg/j	DJA* µg/kg/j
SCF 2002/ Europe	Tyl et al. 2002	5	10
ECB 2003/ Europe	Tyl et al. 2002	50	
AIST 2005/Japon	Tyl et al. 2002	5ou 50	0.5
EFSA 2006-2008/ Europe	Tyl et al. 2002,2008	5	50
ECB 2008/Europe	Tyl et al. 2002,2008	50	
NTP-CERHR 2008/USA	Tyl et al. 2002,2008	4.75	50
US FDA2008/USA	Tyl et al. 2002,2008	5	
Health Canada2008/Canada	Tyl et al. 2002,2008	5	25

\*NOAEL : « No Observable Adverse Effect Level => dose sans effet toxique (dose la plus élevée d'une substance pour laquelle aucun effet toxique n'est observé) ; \*DJA : dose journalière acceptable.

En Janvier 2015, l'Agence Française de Sécurité Alimentaire (EFSA) a publié une réévaluation du BPA qui expliquait que le BPA ne pose pas de risque pour la santé des consommateurs. En se basant sur de nouvelles données et de nouvelles méthodologies disponibles, l'EFSA a abaissé le niveau de sécurité estimé, connu sous DJA de 50µg/Kg/j à 4µg/kg/j (EFSA., 2015).

Depuis quelques années, un débat sur les risques liés à l'exposition au BPA agite la communauté scientifique entre les tenants de la toxicologie réglementaire et les endocrinologues (Myers *et al.*, 2009). Ce débat concerne essentiellement les effets du BPA à de faibles doses. Classiquement, les effets des substances chimiques sont décrits comme suivant une courbe monotone dose réponse. Néanmoins, pour certains scientifiques, les substances chimiques environnementales dont le BPA ayant une activité hormonale ne répondraient pas à ce principe et pourraient provoquer à de faibles doses des effets opposés à ceux observés à fortes doses. Cela a constitué des signaux d'alerte pour les pouvoirs publics et les agences sanitaires. Cependant, à ce jour, le BPA n'a pas été considéré comme VHC (Very High Concern) ou SVHC (Super Very High Concern) car il n'a pas été démontré qu'il était

toxique (Tab.6), cancérigène, persistant ou bioaccumulable (Flint et al., 2012 ; INERIS., 2010).

Tableau 6. DL50/CL50 du bisphénol A (ECB., 2003)

Voie	Espèce	DL50/CL50
Inhalatrice	Rat	> 170 mg/m3
Orale	Rat	3 200-5 660 mg/kg
	souris	5 200 mg/kg mâles 4 100 mg/kg femelles
	Lapin	2 230 mg/kg
Cutanée	Lapin	3 600 mg/kg

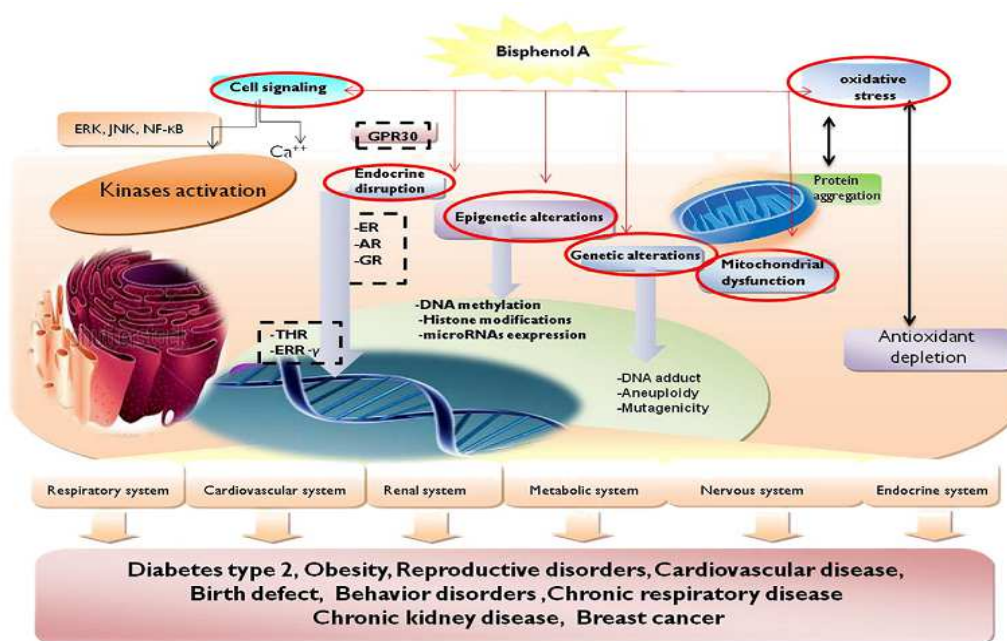


Figure 12. Altérations métaboliques du bisphénol A (Rezg et al., 2014).

### 1.7.1 Effet sur la reproduction :

Certaines études épidémiologiques et toxicologiques suspectent la reprotoxicité du bisphénol A (BPA) mais les agences sanitaires lui classé repro-toxique de catégorie 3 (ni cancérigènes ni mutagènes) (INSERM., 2010). En effet, l'étude de Nakamura et son équipe (2010) a révélé une diminution de la concentration de la testostérone et LH suivant un traitement par le BPA (0, 20, 100 et 200 mg/kg/jr) ou l'E2 (10 et 100 µg/kg/jr) pendant six

semaines, mais aucun effet sur la concentration de l'E2 et FSH. Outre, un déclin de l'expression des enzymes stéroïdogéniques et cholestérol carrier protein ainsi l'expression de  $\alpha$ -mRNA récepteur ostrogénique a été observé au niveau des cellules de Leydig chez les groupes traités par le BPA et l'E2 ce qui affecte leurs nombre. De plus, Yeung et ses collaborateurs (2011) ont trouvé même résultats d'inhibition de l'expression des enzymes stéroïdogéniques 3-HSD, CYP17A1 and 17-HSD3 au niveau des microsomes testiculaires des rats et de l'homme. Le bisphénol A perturbe l'homéostasie testiculaire des animaux de laboratoire ce que *El-Beshbishy* (2013) a noté comme résultat de son étude. Il a enregistré une diminution de la concentration de la testostérone et de protéines totales testiculaires, diminution de l'activité des enzymes testiculaires ; acide phosphatase, alcaline phosphatase et lactate déshydrogénase, monoamine oxydase et NADH déshydrogénase. Ainsi, un déséquilibre du statut antioxydant/ pro-oxydant est suite l'administration orale du BPA (10mg/kg/jr) : chute de l'activité enzymatique de la glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase et la catalase testiculaire avec un excès de peroxydation lipidique. Outre, *Chitra* et ses collègues (2003) ont signalé l'effet délétère de l'administration du BPA (0.2, 2 et 20  $\mu$ g/Kg/jr) pendant 45 jours. Cette étude a révélé un déséquilibre de l'homéostasie de l'épididyme ; réduction de la motilité et de la concentration du sperme épидémique. Ainsi, une diminution de l'activité enzymatique du superoxide dismutase, glutathione reductase, glutathione peroxidase et la catalase avec une surproduction de l' $H_2O_2$ .

Quelques études épidémiologiques ont été réalisées chez l'homme mais restent peu informatives quant aux effets à long terme du BPA. 84 travailleurs de 3 usines utilisant de BADGE (bisphenol A diglycidyl ether) afin de durcir des résines époxy ont été l'objet de d'évaluation par *Hanaoka* et ses collaborateurs. 42 entre eux n'utilisaient pas le BADGE. Un prélèvement urinaire a eu lieu entre 10 et 12 h du matin afin de doser la concentration en BPA et en métabolites de solvants organiques auxquels les travailleurs étaient potentiellement exposés ; une prise de sang le même jour a permis le dosage des concentrations plasmatiques de 3 hormones (LH, FSH et testostérone). Les niveaux médians de LH et testostérone libre étaient inchangés chez tous les travailleurs. La concentration de FSH plasmatique tendait à diminuer en fonction de la concentration urinaire du BPA. Bien que, le niveau médian du BPA était environ le double pour les travailleurs utilisant le BADGE que pour ceux ne l'utilisant pas ; la moyenne était supérieure de 2,5  $\mu$ Mol/Mol<sub>créatinine</sub> pour les exposés (*Hanaoka et al., 2002*). Une diminution de la fonction sexuelle est obtenue par Li et ses

collaborateurs en examinant des travailleurs dans une usine de résine époxy en Chine (*Li et al., 2010*).

Une étude portant sur 300 femmes coréennes au moment de l'accouchement, a trouvé des concentrations plasmatiques comprises entre la limite de détection et 66,48 µg/l alors que dans le sang du cordon, les valeurs ne dépassaient pas 8,86 µg/l. En Allemagne, une étude menée chez 599 enfants âgés de 3 à 14 ans fait apparaître des taux urinaires moyens de BPA total de 2,7 µg/l (*Lee et al., 2008*). Ce sont chez les enfants les plus jeunes (3-5 ans) que les concentrations les plus élevées ont été observées (3,5 µg/l). Enfin, si aucune augmentation du BPA n'a été détectée chez les nouveau-nés ayant des testicules non descendus en France (*Fenichel et al., 2012*), des données récentes ont montré une corrélation négative entre les concentrations de BPA et d'insuline-like 3 (INSL3) (*Fenichel et al., 2013*). L'INSL3 régit la descente trans-abdominale des testicules fœtaux depuis leur position initiale méso-néphrotique jusqu'à l'entrée du canal inguinal (*Ivell et al., 2009*).

Depuis ce qui précède, le niveau détecté du BPA est inférieur de la NOAEL. Cependant, une nouvelle étude fondée par une équipe française a montré que les testicules de fœtus humain sont plus sensibles au bisphénol A que ceux des souris ou des rats. Eladak et ses collaborateurs ont développé un nouveau système de culture [*r/m/h FeTA (rat/mouse/human Fetal Testis Assay)*] qui permet l'étude uniquement de l'effet direct d'un composé sur les cellules testiculaires sans prendre en compte les boucles de rétroaction potentielles extra-testiculaires ou les actions qui pourraient compenser ou affecter les effets des produits chimiques exogènes (*Eladak et al., 2015*). Ils ont comparé la sécrétion de la testostérone basale et stimulée par LH des testicules fœtaux de rats, souris et humains explantés à des stades de développement comparables (14.5 dpc, 12.5 dpc et 6.3-11.1 GW, respectivement) et cultivés avec le système FeTA pour 3- 4 jours. Avec les testicules de rat et de souris, le taux de la sécrétion basale a augmenté pendant 2-3 jours et a été maintenu ou diminué par la suite. Avec les testicules fœtaux humains, la moyenne de la sécrétion basale quotidienne a progressivement diminué tout au long de la culture, mais l'évolution individuelle a changé en fonction du stade de développement. La capacité à répondre à la LH était plus élevée chez les rongeurs que chez les humains, et le taux de sécrétion de testostérone stimulé par la LH augmentait tout au long de la culture chez les rats alors qu'il était stable chez les souris et les testicules humains (*Eladak et al., 2015*).

### 1.7.2. Les autres effets :

Le bisphénol A est suspecté de se lier aux autres récepteurs et perturbe leurs cascades fonctionnelles. Une corrélation a été observée entre les teneurs urinaires en BPA les plus élevées et les patients souffrants des maladies coronariennes, l'augmentation de la thyroxine libre chez les enfants en surpoids et obèses et l'accumulation de lipides (*Shankar et al., 2012 ; Trasande et al., 2012*). Outre, le diabète de type 2, la résistance à l'insuline, les troubles cardiovasculaires et l'hypertension sont d'autres maladies à l'origine de l'adulte qui ont été associées à l'exposition au BPA chez l'adulte (*Batista et al., 2011 ; D'Cruz et al., 2012*). Alonso-Magdalena (2010) a montré que de faibles doses de bisphénol A et de diéthylstilbestrol peuvent altérer les signaux de  $Ca^{2+}$  dans les cellules  $\alpha$  pancréatiques des îlots de Langerhans.

En évidence, une grande partie de la littérature a fait un lien étroite entre la présence du bisphénol A et la génération d'espèces réactives de l'oxygène au niveau des mitochondries de différentes cellules (*Bindhumol et al., 2003 ; Huc et al., 2012 ; Eid et al., 2015*) ce qui résulte un déséquilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant : c'est le stress oxydant.



*Chapitre II*

## 2. Stress Oxydatif :

La documentation scientifique a caractérisé le stress oxydant comme étant le facteur majeur dans les effets délétères du bisphénol A. En théorique, le bisphénol A agit comme une hormone ostrogénique en faisant augmenter les réactions métaboliques résultant ainsi des ROS. En effet, un déséquilibre sera apparu entre les processus biochimiques de production de ces espèces réactives oxydantes (ROS) et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination. C'est ce qu'on appelle un stress oxydatif (Favier., 2003). Ainsi, le but de cette deuxième partie bibliographique est de faire un point explicatif bref sur les principaux mécanismes de l'organisme de protection contre ces ROS.

### 2.1. Présentation des notions d'espèces réactives oxydantes :

Les espèces oxygénées actives (EOA ou ROS Reactive Oxygen Species) désigne les dérivés réactifs de l'oxygène qui peuvent être définies : des molécules qui contiennent de l'oxygène et sont plus réactives que l'oxygène présent dans l'air pouvant réagir avec les composés biologiques et induire certains dégâts cellulaires. Les ROS incluent les radicaux libres ( $O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ) (contenant un ou plusieurs électrons non appariés) et des composés réactifs oxydants non radicalaires (sans électrons libres dans leur couche externe) comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide hypochloreux (HOCl), l'oxygène singulet, et l'ozone ( $O_3$ ). Plus récemment les espèces azotées actives (EAA ou RNS Reactive Nitrogen Species) ont été définies comme un sous-groupe d'oxydants dérivés de l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (NO) (Morel et Barouki., 1999).

Tableau 7. Principales espèces réactives oxydantes (ERO) et azotés (ERA) (Morel et Barouki., 1999).

ERO	Abréviation	Lewis adapté
<u>Espèces oxygénées actives</u>		
Radical (ion, anion) superoxyde	$\bullet O_2^-$	$\cdot \quad   \quad O \bullet \bullet O \quad   \quad \cdot$
Radical hydroperoxyde	$HO_2 \bullet$	$H \bullet \bullet \quad   \quad O \bullet \bullet O \quad   \quad \cdot$
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$	$H \bullet \bullet \quad   \quad O \bullet \bullet O \quad   \quad \bullet \bullet H$
Radical hydroxyle	$\bullet OH$	$\cdot \quad   \quad O \bullet \bullet H$
Singulet oxygène	$^1O_2$	$  \quad O \bullet \bullet O \quad  $
Ozone	$O_3$	$  \quad O = O + \bullet \bullet O \quad  ^-$
<u>Espèces azotées actives</u>		
Oxyde Nitrique ou monoxyde d'Azote	$\bullet NO$	$\cdot \quad   \quad N \bullet \bullet O \quad   \quad \cdot$
Dioxyde d'azote	$\bullet NO_2$	$\cdot \quad   \quad N \bullet \bullet O \quad   \quad \bullet \bullet O \quad  $
Peroxynitrite	$ONOO^-$	$\cdot \quad   \quad O \bullet \bullet N \bullet \quad   \quad \bullet \bullet O \quad   \quad \bullet \bullet O \quad  ^-$
<u>Espèces soufrées actives</u>		
Radical thiyl	$RS \bullet$	$R \bullet \bullet S \quad   \quad \cdot$

La réactivité des espèces chimiques qui dérivent de ce dioxygène est, elle aussi, relative. En effet, l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sont très sélectifs dans leurs réactions avec les molécules biologiques et ne vont, par exemple, interagir qu'avec quelques enzymes. Au contraire, le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) réagit avec toutes les molécules présentes à proximité (Gardès-Albert *at al.*, 2003).

## 2.2. Surproduction des ROS et le stress oxydant :

Les ERO dérivés de l'oxygène et de l'azote sont reconnus pour leur caractère ambivalent physiologique et physiopathologique (Favier., 2003). En condition dite "physiologique", la production des ERO reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène capté par la respiration. Elle est alors indispensable en basses concentrations à l'organisme en participant aux divers processus vitaux tels que : la synthèse de l'ADN, des hormones stéroïdes, des acides biliaires, des acides gras insaturés, aux réactions dépendantes de la Vitamine B12, à la biosynthèse des mitochondries...etc, la défense immunitaire contre les agents pathogènes et la destruction par apoptose de certaines cellules tumorales (Garait., 2006).

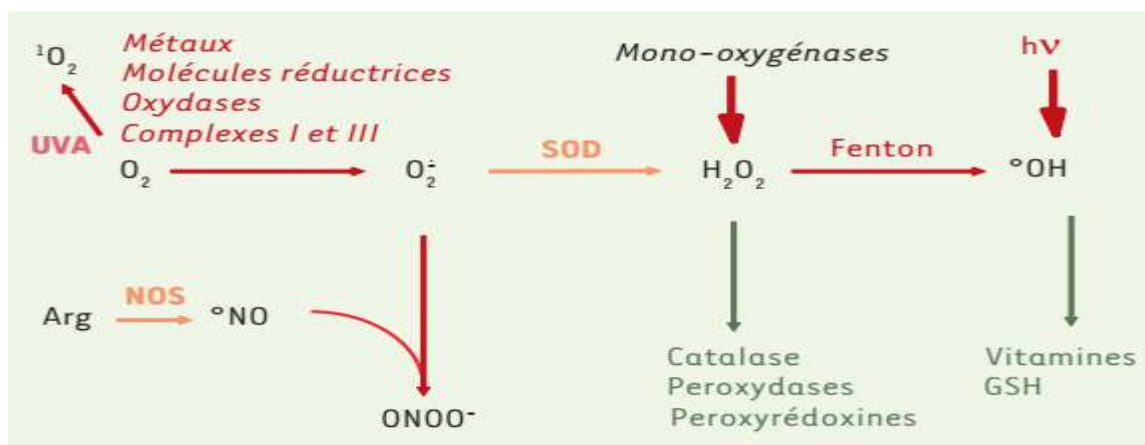


Figure 13. Voie métabolique de l'oxygène et des EROs (Barouki .,2006).

Cependant, cette production de ROS peut être amplifiée de façon exagérée par différents mécanismes physiopathologiques (inflammation, activité sportive...) ou facteurs environnementaux (alcool, médicament, rayons ultra-violets, pesticides...) créant un déséquilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant : c'est le stress oxydant. La cellule ne contrôle alors plus cet excès de ROS qui va engendrer une toxicité cellulaire provoquant des pathologies sévères (Alzheimer, diabète, cancer, psoriasis...) (Fig.14). Ainsi, ayant besoin

d'une certaine quantité de ROS, l'organisme ne cherche pas éliminer mais à contrôler leur niveau pour éviter ce stress oxydant.

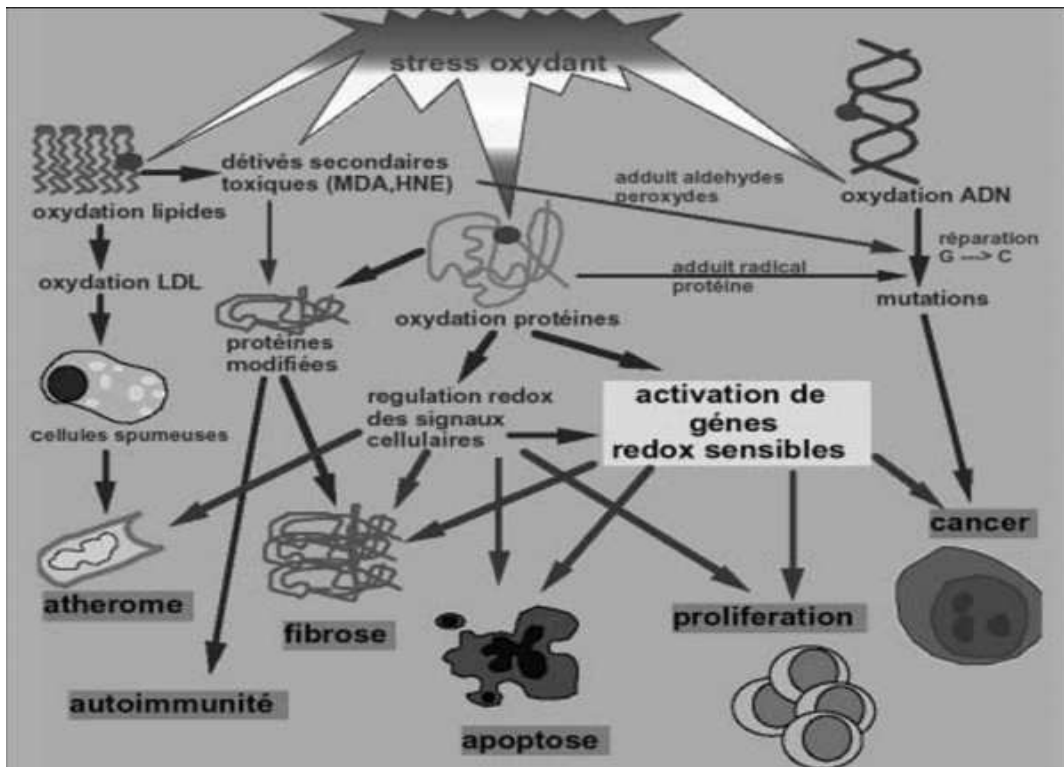


Figure 14. Conséquences pathogènes du stress oxydant (Favier., 2006).

### 2.3. Système antioxydant de l'organisme :

Bien expliqué précédemment, les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ces ROS est assuré par des systèmes antioxydants résultant alors la notion du potentiel redox intercellulaire (Fig.15). Ce dernier est la résultante de l'état redox des couples oxydo-réducteurs présents dans la cellule qui peut s'apparenter à la notion de pH cellulaire associée aux couples acido-basique. Cette stratégie de défense est bien divisée en deux systèmes. Le premiers est dit endogène lui-même est divisé en deux autre sous unités : enzymatique et non-enzymatique. Le deuxième système est dit exogène qui renferme plusieurs molécules telles que les oligoéléments (Se, Cu, Mn, Fe...) et les vitamines (vit E, vit C...) (Garait., 2006).



**A. Superoxyde dismutase (SOD) :**

Le SOD est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène (Eq.1). Le SOD existe sous plusieurs iso formes dont le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme. On distingue : les superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, des superoxydes dismutases à cuivre-zinc protégeant le cytosol (cCu-ZnSOD), la face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD) (*Zelko et al., 2002*). La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu.



**B. Glutathion peroxydase (GPx) :**

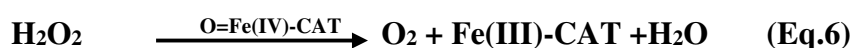
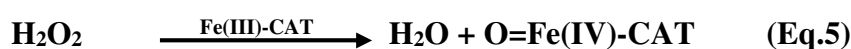
La GPx est une séléno-enzyme présente dans le sang, les membranes et le cytosol. Elle agit en synergie avec le SOD pour protéger l'organisme des dégâts induits par le peroxyde d'hydrogène et des peroxydes organiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol (*Matés et al., 1999*). En présence de glutathion réduit (GSH), elle réduit l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O (Eq.2), les hydroperoxydes (ROOH) en alcools (ROH) (Eq.3), et la dégradation peroxynitrite (Eq.4).



Selon leur emplacement cellulaire et la spécificité de substrat, Il existe plusieurs isoformes de la GPx codés par des gènes différents. La GPx-1 est exprimée dans toutes les cellules et plus abondant dans le foie, les poumons et les reins. La GPx-2 est exprimé dans l'épithélium gastro-intestinale avec toutefois moins d'affinité pour l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La GPx-3 est synthétisée au niveau des cellules tubulaires proximales du rein puis sécrétée dans le plasma. La GPx-4 a 3 isoformes (cytosolique, nucléaire et mitochondriale). L'efficacité de la GPx est liée à un flux constant de GSH, et elle est couplée à l'oxydation du glucose-6 phosphate en 6-phospho gluconate, source de NADPH qui est utilisé comme cofacteur par la glutathion réductase (GRase) pour régénérer le GSH (*Reichel., 2010*).

### C. Catalase (CAT) :

Elle est une enzyme hémique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Eq.7) Avec le fer comme cofacteur, la catalase est essentiellement présente dans les peroxysomes hépatiques, mais aussi dans les hématies et les mitochondries des cellules cardiaques. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, créant de ce fait une molécule d'eau et un groupement Fe(IV)=O hautement oxydant (Eq.5) (*Putnam et al., 2000*). Ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène et de l'eau (Eq.6) :



### D. Glutathion S-transférase (GST) :

Le GST est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (Eq.8) (*Bonnefont Rousselot et al., 2003*). L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit :



### E. Hème oxygénase :

Protéines redox de petits poids moléculaires, les hèmes oxygénases (HO) sont des membres de la famille des protéines de stress heat shock proteins (HSP, HO-1) (*Ryter., 2006*). Elle a Trois isoformes (HO-1, -2, et -3) dont l'HO-1 est fortement activée dans la rate et les autres tissus qui dégradent les globules rouges sénescents. Les HO catalysent la dégradation de la molécule d'hème, potentiellement oxydante, en biliverdine, dans une réaction générant du fer et du monoxyde de carbone (CO) (Fig.16). La biliverdine est alors réduite en bilirubine aux propriétés antioxydantes en tant que *scavenger* d'ERO (*Abraham., 2008*). Le CO est

quant à lui un vasodilatateur dont les propriétés anti-inflammatoires ont été rapportées récemment.

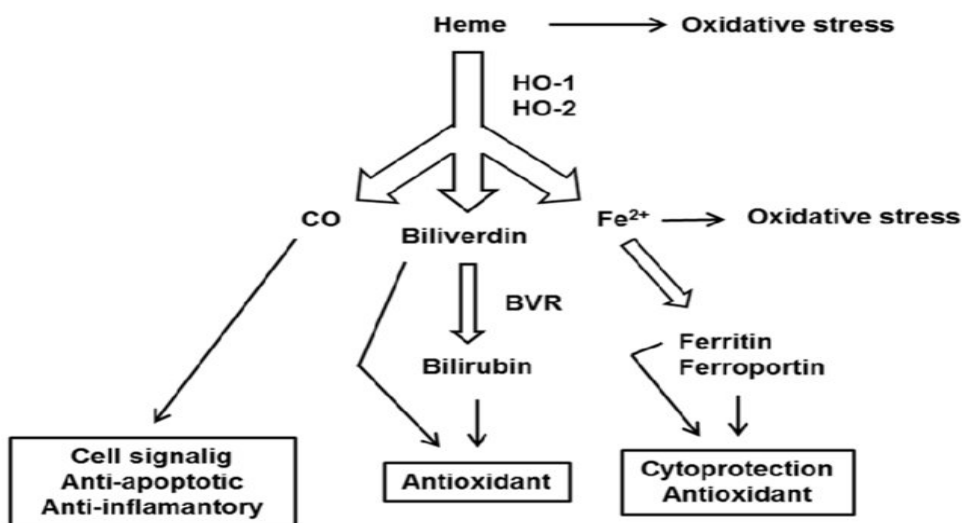


Figure 16. Rôles anti-stress des hèmes oxygénases (HO-1) (Němeček et al., 2017).

### 2.3.1.2. Antioxydants non-enzymatiques :

#### A. Glutathion :

Le GSH est un composé de petit poids moléculaire, non fourni exclusivement par l'alimentation mais aussi synthétisé par l'organisme, assure un rôle antioxydant. Les principales propriétés biochimiques du GSH lui sont conférées par sa fonction thiol (Del Corso et al., 2002). Couplé à sa forme disulfure/oxydée GSSG, le GSH représente le tampon redox le plus important de la cellule, et son équilibre redox (ratio GSSG/2GSH) (Eq.9) constitue le meilleur indicateur de l'environnement redox de la cellule (Ostergaard et al., 2004). Ce ratio est déterminé par les enzymes glutathion peroxydase (GPx) et GR.



Le potentiel antioxydant du glutathion lui vient de sa capacité à protéger les cellules de presque toutes les ERO ( $\text{OH}\cdot$ ,  $1\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{ONOO}$ ,  $\text{RO}^\circ$ ,  $\text{RO}_2^\circ$ ), en les réduisant directement, ou indirectement en tant que substrat de la réaction couplée à la GPx. Le glutathion occupe une place de pivot cellulaire dans la mise en jeu de voies adaptatives et de défenses. D'ailleurs, diverses sources de stress oxydant entraînent une augmentation excessive du rapport GSSG/GSH en modulant les voies de signalisation connectées au statut redox due aux (Evans., 1999).

## **B. Les Méthallo-thionines :**

Des dérivées métalliques d'une protéine riche en soufre : la thionéine. Ces protéines régulent les concentrations intracellulaires en métaux (cuivre, zinc, cadmium, mercure) en les séquestrant, prévenant ainsi leur circulation sous leur forme libre pro-oxydante. Induites lors d'intoxications aux métaux notamment, les méthallothionéines préviennent donc la mise en place de processus oxydatifs (*Petersen et al., 2008*).

### **2.3.2. Système exogène :**

Pour rétablir la balance stress oxydant/antioxydants, il paraît judicieux de renforcer les défenses naturelles de l'organisme par des apports en antioxydants exogènes (*Favier, 2003*). Ces derniers sont très nombreux et des livres entiers ont été publiés sur leurs importances pour les organismes et encouragent d'avoir une bonne alimentation. En font partie les polyphénols, la bêta-carotène, les vitamines (A, C et la vitamine E) ainsi que les oligoéléments (Zn, Cu et le sélénium) (*Garait., 2006*).

Nombre croissant des études précédentes a illustré une relation étroite entre la vitamine E et le sélénium en débusquant les ROS générés de différentes molécules perturbatrices. On s'intéresse dans notre étude au rôle protecteur de la vitamine E et le sélénium en synergie contre les ERO générés par le BPA.

### 2.3.2.1. Vitamine E :

#### A. Propriétés physicochimique :

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, nom proposé pour la première fois en 1936 par Evans et collaborateurs. Ce nom provient du grec *tokos* pour progéniture et *pherein* pour porter. Cette vitamine est présentée en deux familles : les tocophérols et les tocotriénols (Fig.17). Chaque une de ces familles est divisée en quatre sous familles (Cuvelier et al., 2003).

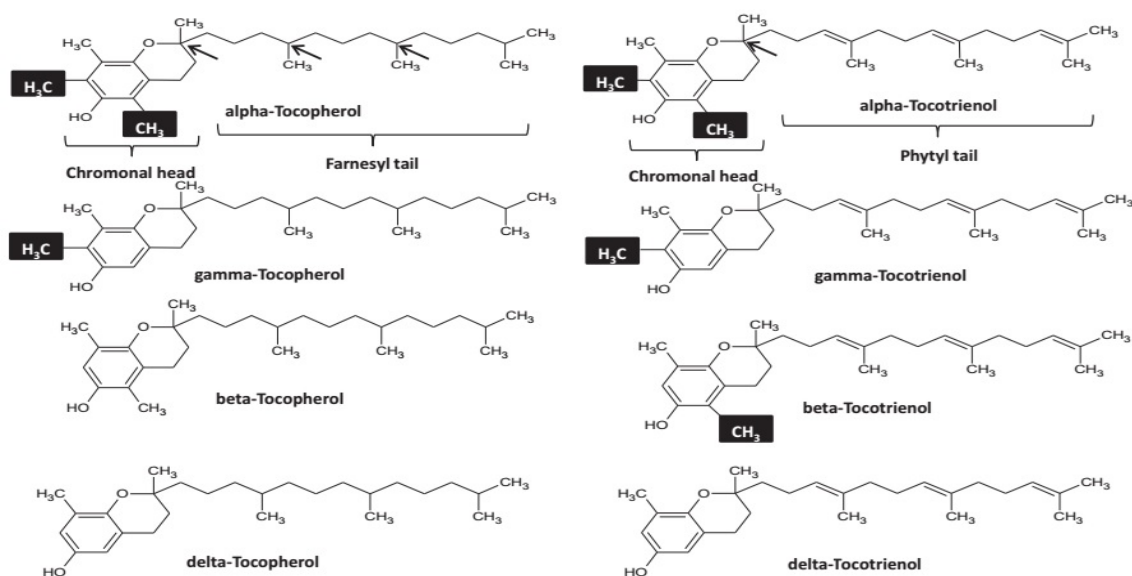


Figure 17. Structure chimique des tocophérols et des tocotriénols (Lindsay et Astley., 2002).

Une vitamine liposoluble indispensable pour le bon fonctionnement de l'organisme. Elle est une molécule antioxydante intra et extracellulaire, localisée dans les membranes et les lipoprotéines. Elle élimine les radicaux peroxydes intermédiaires, dérivés de la peroxydation lipidique (Mukai., 1993).

#### B. Biosynthèse :

La biosynthèse de la vitamine E s'effectue dans les plantes, les algues et certaines plantes non photosynthétiques telles que les champignons mais pas chez les animaux. Il existe 2 voies de synthèse conduisant à la formation de la vitamine E (Cuvelier et al., 2003), la voie des tocotriénols et la voie des tocophérols :

- ✓ Dans la première ; la voie des tocotriénols ; l'acide homogentisique réagit avec une molécule de géranylgeranyl pyrophosphate pour donner un intermédiaire, le 6-

géranylgéranyltoluquinol, qui donnera naissance à un tocotriénol monométhylé, le  $\delta$ -tocotriénol. Des méthylations supplémentaires permettront d'obtenir le  $\beta$ -tocotriénol, le tocotriénol et l' $\alpha$ -tocotriénol. La chaîne latérale peut ensuite être saturée pour former l' $\alpha$ -tocophérol.

- ✓ Lors de la seconde voie ; voie des tocophérols ; une molécule de *phytyl diphosphate* est greffée sur le carbone 6 de l'*acide homogentisique* simultanément à une réaction de décarboxylation, pour former le *2-méthyle-6 phytylplastoquinol* ou *phytyltoluquinol*. Une méthylation en position 3 permet la synthèse du *2,3-diméthyle-6-phytylplastoquinol*, qui subira une étape de cyclisation pour former le  *$\gamma$ -tocophérol*. Une deuxième méthylation en position 5 donne l' *$\alpha$ -tocophérol*. La synthèse du  $\delta$ - et du  $\beta$ -tocophérol n'a pas encore été clairement élucidée, mais il est vraisemblable qu'elle se produise à partir du 2-méthyle-6-phytylplastoquinol.

### C. Sources alimentaires :

Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de définir exactement les besoins journaliers moyens en vitamine E d'un adulte. Les valeurs de référence sont donc des valeurs estimatives. Pour les hommes, cette valeur se situe entre 12 et 15 mg /jour et pour les femmes entre 11 et 12 mg /jour (*Bühner-Astfalk et al., 2011*).

La source alimentaire majeure de la vitamine E est la végétation (*Bonvehi et al., 2000*), les éléments les plus riches étant les céréales et les huiles.

- **les céréales** : contiennent généralement les 4 formes de tocophérol et très souvent aussi des tocotriénols. Il apparaît que le blé est moins riche en teneur de l' *$\alpha$ -tocophérol* que le maïs (Tab.8).

Tableau 8. La teneur en tocophérol et en tocotriénol dans les céréales (*Surai., 2002*).

Aliment	Tocophérols			Tocotriénols	
	$\alpha$	$\beta$ - et $\gamma$	$\delta$	$\alpha$	$\beta$ - et $\gamma$ -
<b>Blé</b>	9.0	7.7	0.3	4.2	41.9
<b>Orge</b>	5.7	3.9	0.3	19.5	16.9
<b>Mais</b>	13.7	46.1	-	-	-
<b>Avoine</b>	3.4	1.8	0.4	8.1	1.9
<b>Fève de soja</b>	4.1	19.5	4.7	0.3	0.8

• **Les huiles végétales** : constituent la meilleure source de tocophérols/ tocotriénols. À titre d'exemple, les teneurs varient de 10 à 1000 mg/kg dans l'huile de maïs (Tab.9).

Tableau 9. La teneur en tocophérol et en tocotriénol dans les huiles (Bonvehi et al., 2000).

Huile	Tocophérols (µg/ml)			Tocotriénols (µg/ml)		
	α	γ	δ	α	Γ	δ
H. de palme	198	-	11	210	408	87
H.de tournesol	765	-	-	-	-	-
H.de noix	12	517	61	-	-	-
H.de noisette	425	68	17	-	-	-
H.de maïs	263	1365	88	-	-	-

Les fruits et légumes sont également des sources de vitamine E, mais dans une moindre mesure :

- **les fruits** : contiennent des quantités faibles, à l'exception des mûres (4,3mg/100g). Les pommes et les poires renferment plus de vitamine E dans la peau que dans la chair.
- dans les légumes, le taux de vitamine E dépend de la partie de la plante, il est élevé dans les feuilles et surtout dans les feuilles vertes à maturité.

Au niveau des produits d'origine animale, il faut signaler que la vitamine E est présentée essentiellement sous forme d'α-tocophérol mais en quantité assez restreinte dans les tissus animaux (muscles et organes). Dans le lait de vache, la forme α-tocophérol est largement prédominante. La richesse en vitamine E du lait et des produits qui en dérivent dépend de l'alimentation des vaches (Artur et al., 1994).

#### D/ Activités biologiques :

Au plan physiologique, la vitamine E est un antioxydant majeur des structures lipidiques. Grâce à sa double affinité pour les lipides (grâce à sa chaîne latérale) et pour les protéines (grâce à son noyau chromanol), la vitamine E s'accumule au niveau des membranes cellulaires et intracellulaires en exerçant une action stabilisatrice (Grimm et al., 2016). Ainsi fixée, elle protège les acides gras insaturés des membranes contre l'oxydation. Cette protection prend place lors de la deuxième phase de la peroxydation lipidique dite la propagation (Fig.18). Après la formation d'un radical péroxyle (LOO°) (phase d'initiation)



Ce processus prévient la dégénérescence musculaire et hépatique, la stabilité des membranes des spermatozoïdes et protège aussi de l'oxydation d'autres vitamines (dont la vitamine A), des hormones et des enzymes (Duchadeau., 2001). Un manque de sélénium et de vitamine E affecte la conversion de la méthionine en cystéine (Combs et al., 1981). L' $\alpha$ -tocophérol piège aussi le radical peroxy-nitrite, un agent oxydant, dont la formation dans la paroi vasculaire est importante tout au long du processus aboutissant à la lésion athérosclérotique (Cano et al., 2007).

Cette activité antioxydante de la vitamine E est renforcée grâce à la mise en place de chaînes d'oxydoréductions faisant intervenir des molécules soufrées (cystéine, glutathion) et le sélénium (coenzyme des glutathion peroxydases cytoplasmiques et mitochondriales) (Louisot, 1983) (Fig.19).

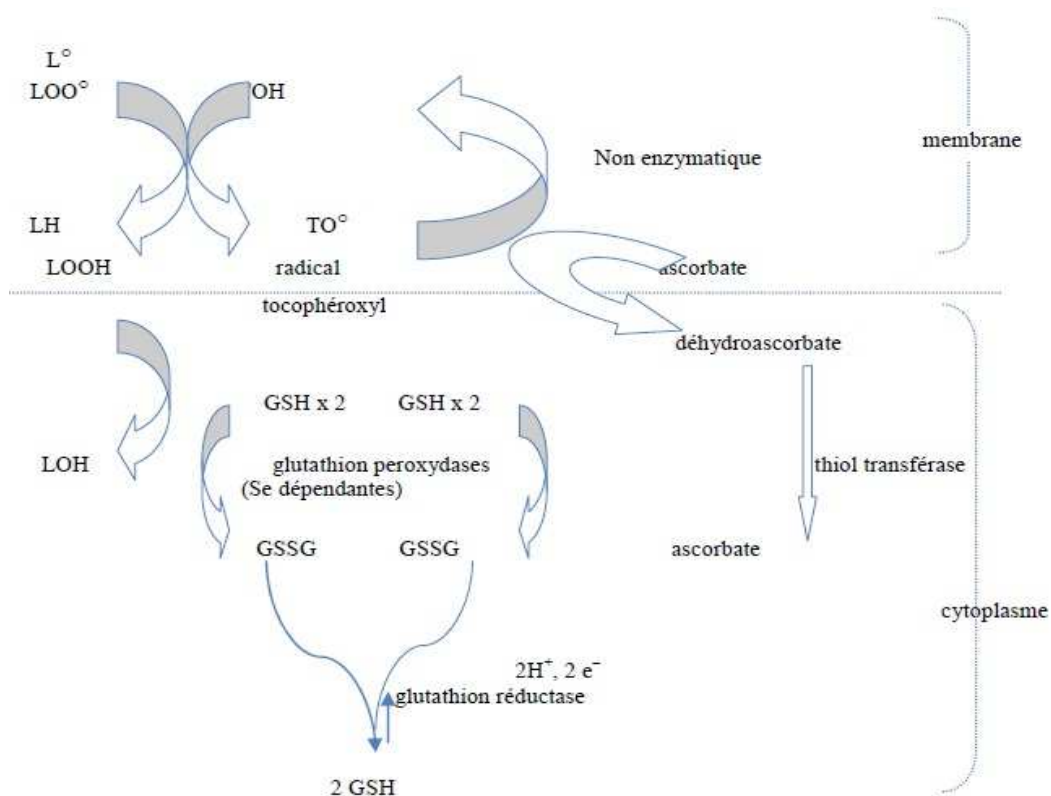


Figure 19. Rôles antioxydants de l'  $\alpha$  tocophérol en synergie avec les autres systèmes antioxydants (Louisot., 1983).

De plus, la vitamine E joue de nombreux rôles qui ne s'expliquent pas par son action antioxydante. L' $\alpha$ -tocophérol a une action antiproliférative vis-à-vis des cellules musculaires lisses *in vitro*, une action inhibitrice sur l'expression de récepteurs et de protéines d'adhésion et chimiotactiques, sur la production de cytokines pro-inflammatoires ou impliquées dans l'allergie. La localisation membranaire de la vitamine E lui donne un rôle stabilisant et anti-

hémolytique sur les globules rouges. La vitamine E, étant essentiellement transportée par les lipoprotéines, prévient l'oxydation des LDL, impliquées dans le développement de la plaque d'athérome. Il existe une corrélation inverse entre le taux plasmatique de la vitamine E et le risque des maladies cardiovasculaires (MCV) (Léger., 2000).

La vitamine E agit sur la thyroïde et les glandes surrénales en synergie avec le sélénium stimulant la réponse immunitaire (Larbier et al., 1992). Ainsi, elle participe à l'absorption intestinale et au transport du fer, lequel entre dans la structure de l'hème (Mikulets., 1996), la synthèse des protéines hémiques, dont les cytochromes et l'hémoglobine (Larbier et al., 1992).

### **E/ Métabolisme :**

Après hydrolyse intestinale et entérocytaire des esters, les tocophérols sont transportés dans le sang associés aux lipoprotéines (Une protéine de transfert de l' $\alpha$ -tocophérol, l' $\alpha$ -tocophérol transfer protein ( $\alpha$ -TTP), incorpore préférentiellement le RRR- $\alpha$ -tocophérol dans les VLDL exportées par le foie). Le taux d'absorption de l'alpha-tocophérol est voisin de 70 % et est conditionné par la présence de sels biliaires, de lipase pancréatique, et par la teneur en lipides de la ration alimentaire. Après digestion, la vitamine E est transportée par les chylomicrons et gagne la circulation générale par voie lymphatique. Après action de la lipoprotéine lipase, la vitamine E est captée par les hépatocytes, puis l'alpha-tocophérol est incorporé aux VLDL dont il suit le métabolisme vasculaire. La concentration plasmatique d'alpha-tocophérol est corrélée à celle du cholestérol total et des phospholipides. Dans la circulation, la vitamine E serait surtout présente au sein des LDL et des HDL, mais il existe de nombreux échanges entre les différentes classes de lipoprotéines. La vitamine E est éliminée par voie biliaire, soit directement, soit après oxydation en quinone, puis réduction en hydroquinone et glucuro-conjugaison (Léger et al., 2007).

### **F/ Carence en vitamine E et hypervitaminose E :**

En 2016, la commission du codex alimentaire a publié un rapport sur les nouvelles valeurs nutritionnelles de référence pour la vitamine E. l'Union européenne (UE) maintient sa position exprimée en 2015, selon laquelle l'UE opterait une valeur nutritionnelle de référence de 12mg pour la vitamine E. Canada réitère son soutien à l'établissement d'une VNR-B pour la vitamine E de 9 mg. Ainsi, l'EFSA a publié un avis sur les DRV pour la vitamine E en fixant un AI pour l' $\alpha$ -tocophérol à 13 mg/jour pour les hommes et 11 mg/jour pour les femmes (CCA., 2016). Vu que ces besoins sont habituellement couverts par l'alimentation, une

carence de cette vitamine est rare. Un déficit en vitamine E est le plus souvent le résultat de prédispositions génétiques ou d'un mauvais développement ; par exemple, chez les bébés nés très prématurément et avec un très faible poids de naissance (<1,5 kg). En effet, ces enfants peuvent être sujets à des problèmes de développement de la rétine, ou un risque plus élevé d'infection. D'autres causes génétiques comprennent un apport insuffisant en protéine ou la malnutrition énergétique. Une anomalie du gène de la protéine de transfert de l'alpha-tocopherol ( $\alpha$ -tocopherol transfert protein ou  $\alpha$ -TTP) est responsable d'une forme de carence restée longtemps inexpliquée : « la carence idiopathique familiale en vitamine E », aujourd'hui dénommée « ataxie avec déficience isolée en vitamine E (AVED ) »; ou est indirectement lié à des syndromes de malabsorption des lipides (tels que A-béta-lipoprotéinémie, lorsque l'intestin est incapable d'absorber les graisses pour retenir la vitamine E) (Léger., 2007). De ce que dit en dessus, elle pourrait à long terme favoriser le développement de pathologies dégénératives. Des carences sont observées dans différentes situations pathologiques : chez les enfants malnutris, au cours de pathologies entéropathiques (anomalies congénitales des voies biliaires, a bêta-lipoprotéinémie, maladie coeliaque, pancréatite chronique, colite ulcéraire, mucoviscidose), au cours de pathologies hémolytiques (bêta-thalassémie majeure, drépanocytose, sphérocytose héréditaire, anémie hémolytique du nouveau-né prématuré), chez les patients hémodialysés chroniques ou atteints de la maladie de Gaucher (Léger., 2007).

Une supplémentation en vitamine E est proposée en cas de carence. Des adultes prennent des doses relativement élevées de la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol 400 à 800  $\mu$ g/jour) pendant des mois voire des années ne présentent aucun problème. Une faiblesse musculaire, fatigue, des nausées et diarrhées sont parfois observées. Le risque le plus important est l'hémorragie. En cas d'apport en vitamine E (> 1000  $\mu$ g/jour), le statut vitaminique K doit impérativement être surveillé car la vitamine E agit négativement sur les propriétés pro-coagulantes de la vitamine K. Chez un patient sous AVK, supplémenté en vitamine E, le risque hémorragique est augmenté. De plus, les analyses d'études antérieures rapportent que des apports élevés en vitamine E peuvent augmenter le risque d'accident vasculaire cérébral ischémique et de décès prématuré (Johnson., 2017).

### 2.3.2.2. Le Sélénium :

#### A/ Propriétés physicochimiques :

Le sélénium ( $\text{Se}^{34}$ ) est un métalloïde du groupe VI A dans le tableau périodique, de masse atomique 79 possédant à la fois des propriétés métallique et non métallique, chimiquement proche du soufre et apparenté au tellure. Il a été découvert en 1817 par le chimiste suédois Jakob Jöns Berzelius, dans les sous-produits de fabrication d'acide sulfurique (*Tinggi., 2003*). Il n'existe pas de minéral à partir duquel le sélénium peut être extrait comme produit primaire mise à part quelques rares minéraux comme la crooksite ( $\text{Cu}_7(\text{Tl,Ag})\text{Se}_4$ ) ou la clausthalite ( $\text{PbSe}$ ). Il se trouve principalement dans les minéraux sulfurés du cuivre, du fer et du plomb et plus communément dans la chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ), la bomite ( $\text{CuSFeS}_4$ ) et la pyrite ( $\text{FeS}_2$ ) (*Devoy., 2001*).

Il est présent très souvent à l'état de traces et sous plusieurs formes isotopiques ; 6 isotopes stables ( $\text{Se}^{74}$ ,  $\text{Se}^{76}$ ,  $\text{Se}^{77}$ ,  $\text{Se}^{78}$ ,  $\text{Se}^{80}$ ,  $\text{Se}^{82}$ ) et au moins 7 isotopes non stables. Parmi eux,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{77m}\text{Se}$  et  $^{81}\text{Se}$  sont utilisés comme marqueurs dans le dosage quantitatif du sélénium mais l'isotope  $^{75}\text{Se}$  est le plus utilisé dans les expérimentations biologiques et ceci du fait de sa longue demi-vie de 120 jours. Le sélénium est allotropique parmi lesquels trois formes sont bien connues :

- ✓ le sélénium amorphe, rouge foncé
- ✓ le sélénium vitreux, d'une masse amorphe
- ✓ le sélénium gris ou sélénium métallique considérée comme la forme la plus stable.

Dans l'organisme, le sélénium est présent sous forme de séléniol ( $\text{R-SeH}$ ) ou de sélénoéther ( $\text{R-Se-R}$ ). Il peut également se combiner au soufre ( $\text{R-S-Se-H}$  ou  $\text{R-S-Se-S-R}$ ) ou s'y substituer pour former de nombreux composés analogues séléniés : sélénométhionine ( $\text{SeMet}$ ) et sélénocystéine ( $\text{SeCyst}$ ) (*Seboussi., 2008*).

Dans la nature, le sélénium est à l'état élémentaire ou sous forme de séléniures ( $\text{Se}^{2-}$ ), de séléniates ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) et ou de sélénite ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ). Cet élément est largement répandu dans l'écorce terrestre avec une concentration moyenne de 0.09 mg/kg. Le sélénium est rarement présenté seul mais souvent comme constituant majeur dans 40 minéraux et comme composé mineure dans 37 autres minéraux. Le Canada, le Japon et les États Unis sont les principaux producteurs de sélénium. Or, il est produit à partir des boues d'affinage du cuivre (*Seboussi., 2008*).

Les principales formes chimiques du sélénium sont regroupées comme suit :

Composés inorganiques

$H_2Se$ :	hydrogène sélénié/ acide hydroséléniq
$H_2SeO_3$ :	acide sélénieux,
$SeO_3^{2-}$ :	sélénite
$H_2SeO_4$ :	acide séléniq,
$SeO_4^{2-}$ :	sélérate ou séléiate

Composés organiques

Acides aminés séléniés

- $H-Se-CH(NH_2)-COOH$ :	sélocystéine
- $CH_3-Se-CH(NH_2)-COOH$ :	méthylsélocystéine
- $CH_3-Se-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ :	sélocméthionine
- $COOH-CH(NH_2)-CH_2-Se-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ :	sélocystathionine

Intermédiaires métaboliques

- $R-S-Se-S-R$ :	séloctrisulfure
- $G-S-Se-S-G$ :	sélocdiglutathion
- $CH_3-Se-CH_3$ :	diméthylséliure
- $(CH_3)_3-Se^+$ :	ion triméthylsélionium

**B/ Disponibilité et sources alimentaires :**

De ce que précède, le sélium est un constituant naturel de la croûte terrestre. Sa concentration dans les sols varie considérablement d'une région du monde à l'autre, allant de 0,1µg/kg dans celles où les sols sont pauvres en sélium à plus de 1000 mg/kg dans les régions séliifères. Cette variation géographique de la teneur en sélium agit le plus souvent sur sa teneur en aliment et en eau en tant que des principales sources alimentaires de cet oligoélément (Merzoug., 2014).

Les besoins quotidiens du sélium chez l'être humain sont présentés dans le *tableau 09*. Selon la Santé Canada, le besoin en Sélium s'accroît avec l'âge en allant de 15µg pour un bébé (0-06 mois) jusqu'à 55µg pour un homme/ femme (50 ans ou plus). Ces besoins ont été couverts par l'alimentation. L'aliment le plus riche en Sélium est la noix du Brésil (340µg) (Santé Canada., 2015). Alors que, la commission de codex alimentaire approuve la détermination de la VNR-B pour le sélium à 60 µg (CCA., 2014).

Tableau 10. Les besoins quotidiens en Sélénium (*Santé Canada., 2015*).

<i>Age</i>	<i>µg/jour</i>
<i>Bébé 0-06 mois</i>	15
<i>Bébés 07 mois -03 ans</i>	20
<i>Enfant 04-08 ans</i>	30
<i>Enfant 09-13 ans</i>	40
<i>Homme 19-50 ans</i>	55
<i>Femme enceinte</i>	60
<i>Femme qui allaite</i>	70

Le sélénium se localise dans la fraction protéique de la plante et du tissu animal. La végétation la plus riche en Sélénium est la noix de Brésil. La teneur du sélénium dans les animaux est moins faible. 75g de l’huître du pacifique contient 116µ du Sélénium par rapport au saumon (28-45µg) et foie du poulet et de la dinde (51-87µg) (*Santé Canada., 2015*). La variation de la teneur alimentaire en Sélénium selon la Santé Canada est présentée dans le *tableau 11*.

Tableau 11. La teneur en Sélénium dans quelques aliments (*Santé Canada., 2015*).

<i>Aliments</i>	<i>portion</i>	<i>Teneur en Sélénium (µg)</i>
<i>Noix de Brésil</i>	5	340
<i>Champignons</i>	125 ml (1/2 tasse)	10-21
<i>Riz brun, blanc</i>	125 ml (1/2 tasse)	8-10
<i>Fromages</i>	50g-250 ml (1 tasse)	7-13
<i>Lait (3.3%,2%,1% écrémé)</i>	250ml (1 tasse)	8-10
<i>Œufs</i>	2 gros	34
<i>Thon</i>	75g	45-53
<i>Huîtres d’élevage</i>	75g	58
<i>Saumon</i>	75g	28-45
<i>Sardines conservées</i>	75g	40
<i>Foie (poulet, dinde)</i>	75g	51-87
<i>Poulet et dinde</i>	75g	12
<i>Mouton canadien</i>	75g	18-27

**C/ Utilisations :**

• **Utilisation industrielle :**

Le sélénium est utilisé en mélange avec d'autres métaux. Parmi eux : sélénites d'aluminium, sulfoséléniure de cadmium et cuivre, sélénite d'ammonium et le sélénite de sodium, sélérate de cuivre, potassium, sodium, dioxyde de sélénium, disulfide de sélénium, monosulfide de sélénium (*Bonnard et al., 2002*). Ces composés sont utilisés principalement dans :

- ✓ la métallurgie qui consomme 10 % de la demande mondiale en sélénium.
- ✓ La fabrication et coloration des verres et de la céramique ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ , Se).
- ✓ En xénographie, pour le virage des impressions photographiques.
- ✓ l'industrie des peintures et des plastiques.
- ✓ l'industrie des pneumatiques, pour augmenter la résistance du caoutchouc.

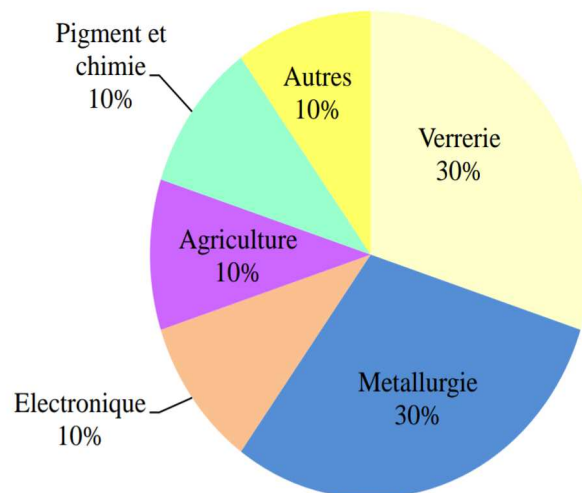


Figure 20. Répartition du sélénium utilisé dans les différents secteurs en 2009 (*George 2010*).

• **Utilisation agricole :** Il est utilisé dans :

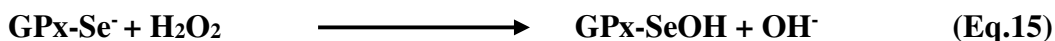
- ✓ les engrais chimiques pour les sols déficients en sélénium.
- ✓ les produits insecticides pour lutter contre l'araignée rouge ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ).
- ✓ La supplémentation alimentaire pour l'animale afin de combattre les maladies d'origine nutritionnelle ( $\text{SeS}_2$ ).
- ✓ Additifs alimentaires (*Lemly., 2004*).

- **Utilisation médicale :** il est utilisé dans :
  - ✓ Les fortifiants prescrits lors d'une fatigue ou faiblesse ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ).
  - ✓ La prévention et correction d'un déficit peut être attendu (insuffisance rénale chronique traité par l'hémodialyse, cirrhose, hyper catabolisme...)
  - ✓ Les médicaments prescrits au cours d'affections musculaires et cutanées.
  - ✓ Certains shampooings anti pelliculaires (SeS).
  - ✓ Le sélénium sous forme de sélénite, séléniate et Se-méthionine est utilisé pour le diagnostic de certains cancers.

**D/ Activités biologiques :**

Bien qu'à des teneurs trace, le sélénium est connu comme un antioxydant indispensable pour l'organisme. Cette importance a été établie en 1957 par une étude démontrant qu'une carence en cet élément pouvait entraîner des troubles plus ou moins graves selon l'espèce, touchant principalement les muscles, le cœur ou le foie (*SturcbJer-Pierrat et al., 1995*).

En 1973, la notion de sélénoprotéine a été mise par la découverte que le sélénium constitue le site actif de la glutathion-péroxydase. Une sélénoprotéine qui protège les composants cellulaires de l'oxydation due aux peroxydes produits par le métabolisme cellulaire (*Rotruck et al., 1973*). La GPx décompose les hydroperoxydes en glutathion réduit. Le Séléniate ( $\text{R-Se}^-$ ) est oxydé par l'hydroperoxyde et forme l'acide séléinique ( $\text{R-SeOH}$ ) (Eq.15) qui à son tour réagit avec le GSH pour donner GS-Se-R (Eq.16). Un deuxième GSH est nécessaire pour libérer du GSSG et de l'eau (Eq17).



De plus, une autre sélénoprotéine a été trouvée chez les plantes : la sélénométhionine considérée moins réactive que les sélénoprotéines (*Moksnes., 1986*). Elle a la même structure que la méthionine sauf que le sélénium y remplace l'atome de soufre. Les plantes absorbent le sélénium inorganique du sol et le convertissent en formes organiques. La sélénométhionine est ainsi la principale forme de sélénium que l'on trouve dans les aliments. Lorsqu'il est assimilé sous cette forme, il se substitue au soufre dans les protéines de l'organisme des animaux et de l'homme. Elle est directement incorporée dans les protéines de l'organisme par

des voies métaboliques similaires à celles utilisées par la méthionine. Elle est convertie en sélénocystéine puis incorporée dans les sélénoprotéines puis éliminée sous forme de serine et sélényde. Le remplacement de la méthionine par la sélénométhionine dans la structure de la protéine n'y induit pas de changement fonctionnel (*Burk., 1991*).

L'iodothyronine déiodinase ; une sélénoprotéine intervient dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes ; la conversion de la thyroxine (T<sub>4</sub>) en (T<sub>3</sub>). Elle présente trois isoformes : DI1 et DI3 sont plus exprimées dans le foie et les reins. La DI2 est plus abondante dans la thyroïde, le cœur, les muscles, les tissus adipeux brins et le système nerveux central. Étant donné que le sélénium est un cofacteur pour non seulement de ces enzymes mais ainsi d'autres sélénoprotéines ; Thioredoxin Reductases, Methionine-R-Sulfoxide Reductase, Selenophosphate Synthetase 2...etc (*Guyot et al., 2007*). L'activité de ces enzymes augmente avec la supplémentation en sélénium. De ce fait, il est bien recommandé d'enrichir notre apports alimentaires en cet oligoélément ainsi d'autres vitamines.

Autrement, le sélénium intervient dans la synthèse de cellules immunocompétentes, des prostaglandines pro- inflammatoires (activité immunologique) (*Finch et al., 1996*). De plus, son rôle important dans la spermatogenèse a été confirmé dès qu'une carence en sélénium diminue la motilité des spermatozoïdes chez le taureau, sans pour autant affaiblir leur viabilité, avec des changements dans leur morphologie chez le rat (*Lebreton et al., 1998*). Il joue un rôle dans le métabolisme normal de la testostérone et dans la morphologie testiculaire, expliquant ainsi la présence de sélénoprotéines dans les gonades (GPx) (150).

### **E/ Métabolisme :**

Le métabolisme du sélénium emprunte différentes voies selon la forme chimique de l'élément, sa concentration et la voie d'administration. L'ingestion du sélénium par la végétation, les dérivés animaux ou ainsi les aliments commercialisés sont considéré comme une voie principale de la disponibilité des deux formes organique et inorganique de cet oligoélément. Ainsi, l'absorption digestive du sélénium est tant plus dominante que celles pulmonaire ou cutanée lors d'une exposition professionnelle. Tandis, en cas d'intoxication, ces deux voies peuvent devenir plus importantes (*Seboussi., 2008*).

L'absorption gastro-intestinale du sélénium est bien documentée chez l'animale que chez l'homme. Chez l'animal (rat, souris ou chien), le taux d'absorption gastro-intestinale est meilleur après administration par gavage (> 80 %) que dans la nourriture (50 %). De plus, le sélénium traverse la barrière placentaire (env. 13 % de la dose ingérée) et se concentre dans l'épithélium neuronal de l'embryon ou les yeux, le foie et le squelette du fœtus ; une quantité

similaire passe dans le lait maternel. Chez l'homme, l'absorption gastro-intestinale lors de prise médicamenteuse de différents composés varie de 44 à 95 % de la dose ingérée (Bisson., 2011).

Puis, le sélénium absorbé est fixé aux érythrocytes, à l'albumine et aux globulines plasmatiques. L'albumine semble être le récepteur immédiat et sert de transporteur vers les sites de fixation tissulaires, en particulier, le foie, les reins, la rate, le pancréas, les os, les ongles et les cheveux (Awadeh et al., 1988a). Chez l'animal, la demi-vie d'élimination est estimée à 40 jours dans le foie et 30 jours dans le sang, les poumons, les reins, la rate, et le cœur. Le passage trans-placentaire a été montré in vitro sur placenta humain perfusé, le pic de concentration, dans la veine et l'artère fœtale, apparaît 120-150 minutes après celui de l'artère maternelle ; 47 % de la dose reste fixé dans le placenta. Puis, sa méthylation en diméthyl-séléniure, diméthyl-di-séléniure ou en ion tri-méthyl-séléniure. Les réactions de méthylation sont catalysées par les méthyl-transférases, des enzymes localisées dans le cytosol des cellules hépatiques et rénales. Finalement, chez le rat, 67 % de la dose administrée est excrétés dans l'urine et 10 % dans les fèces. Chez l'homme, l'élimination est essentiellement urinaire (50 à 70 %), principalement sous forme libre mais également de dérivés méthyles (Guillard., 2011).

### **F/ Déficit et Intoxication en Sélénium :**

Généralement, la variation géographique de la teneur en sélénium conditionne sa teneur dans les plantes. L'aliment venu d'une région déficiente en sélénium ou une malnutrition peut engendrer une carence en cet oligoélément. Un déficit sévère en sélénium est constaté chez une population chinoise atteinte d'une cardiomyopathie endémique virale (insuffisance du muscle et une anémie) dite Keshan (une région où la teneur en sélénium dans le sol et dans l'alimentation est extrêmement faible) (Chen., 2012). Il a été remarqué qu'une supplémentation en sélénium faisait diminuer ces symptômes. En Russie et en Chine sibériennes, les enfants qui grandissent avec une carence en sélénium peuvent développer une ostéoarthropathie chronique (maladie de Kashin-Beck). Associée à une carence en Iode, une carence en sélénium peut contribuer à l'apparition du goitre ou d'une hypothyroïdie (161-162).

Une limite de 10 à 50 µg/l en sélénium a été établie dans l'eau potable (l'OMS 2011., le CEU 2011 et l'EPA 2012). Ainsi, un apport maximal tolérable de 400 µg/jour de sélénium a été établi par l'IOM 2013 et la FDA 2014.

A l'opposé, il est éprouvé que son excès puisse entraîner une toxicité parfois mortelle. Cette toxicité du sélénium est notamment liée au remplacement du soufre par le sélénium

dans les protéines et les acides nucléiques induisant par exemple l'altération de la forme tridimensionnelle des protéines (Lemly., 2002, cité par Fournier., 2005). L'INERIS présente en première approche les VTR publiées par l'ATSDR, l'US EPA et l'OMS (Tab.12). Une Valeur Toxicologique de Référence (VTR) est un indice qui établit la relation entre une dose externe d'exposition à une substance dangereuse et la survenue d'un effet néfaste. Les valeurs toxicologiques de référence proviennent de différents organismes dont la notoriété internationale est variable (INERIS., 2018). De plus, les DL<sub>50</sub> par voie orale ont été déterminées pour différents composés du sélénium (Séléniate de sodium : DL<sub>50</sub>= 1,6 mg/kg, Sélénite de sodium : DL<sub>50</sub>=7 mg/kg chez les rats) (INRS., 2002). La toxicité orale varie avec la solubilité du composé du sélénium.

Tableau 12. Valeur Toxicologique de Référence pour le sélénium (INERIS., 2018) :

Type d'effet	Voie d'exposition	Facteur d'incertitude	Valeur de référence	Source, Année de révision	Origine de la valeur retenue
Effets à seuil Sélénium et ses composés	Orale (chronique)	3	RfD = 5.10 <sup>-3</sup> mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	US EPA, 1991	INERIS, 2011

Une oligospermie, une dégénérescence et une atrophie testiculaire ont été constatés chez des souris mâles injectées par dioxyde de sélénium (0,035 mg/kg/j pendant 90 jours). En cas d'expositions accidentelles, professionnelles ou abuse volontaire de sélénium ; les symptômes associent diversement d'irritations cutanées pulmonaire et oculaire, des troubles digestifs (nausées, vomissements et diarrhées) et des signes neurologiques. De semblables effets indésirables du sélénium sur la santé ont été observés entre autres chez des personnes et des animaux dans des régions sélénifères, parmi lesquelles les immenses plaines du nord des États-Unis (MacFarquhar et al., 2010). À mon avis personnel, il sera bien de respecter la posologie décrite sur la notice des suppléments nutritionnels et d'enrichir notre régime alimentaire pour une vie saine.



*Chapitre III*

### 3. Matériels et Méthodes :

#### 3.1. Produit chimique utilisé :

Le bisphénol A (BPA) [ $C_{15}H_{16}O_2$ , CAS # 80-05-7, Sigma Aldrich] a été dissout dans l'huile d'olive pour faciliter son passage (hydrophobe). On a basé sur les travaux précédents de deux équipes de recherche (*Anjum et al., 2011 ; El-Beshbishy et al., 2013*) ; qui ont évalué les effets reprotoxique de la dose de 10mg/kg de poids corporel chez les rats pendant 14 jours. La dose 10mg est la limite d'exposition professionnelle (VLEP) pour les poussières inhalables dans les lieux de travail en France (art. R. 4412-149 du Code du travail ; décret n° 2012-746 du 09/05/2012).

Le sélénite de sodium [ $Na_2SeO_3$ , CAS # 10102-18-8 sigma Aldrich] est utilisé avec une dose de 0.5mg/kg poids d'aliment. Cette dose a révélé une protection contre le stress oxydant induit par le cadmium, le méthimazol le méthomyl et l'arsenic sur différents organes (*El-Demerdesh et al., 2004 ; Ognjanovic, et al, 2008; Messarah et al., 2012*).

La vitamine E ( $\alpha$ -Tocophérol) [ $C_{29}H_{50}O_2$ , CAS # 59-02-9, Vetoquinol. Italia] est utilisée avec une dose de 100mg/kg poids d'aliment. Cette dose a amélioré les dégâts tissulaires induits par N-nitrosodiethylamine, des métaux lourds, diazinon chez le rat (*Bansal et al, 2005 ; Ben Ammara et al, 2011 ; Messarah et al, 2013*).

D'autres produits utilisés dans les différentes technique de dosage sont obtenu de la société américaine Sigma Aldrich , y compris: acide salicylique [ $C_7H_6O_3$ , CAS# 69-72-7 sigma Aldrich], CDNB [ $C_6H_3CLNO_4$ , CAS# 97-00-7], DTNB [ $C_{14}H_8N_2O_8S_2$ , CAS# 69-78-3], EDTA [ $C_{10}H_{16}N_2O_8$ , CAS# 60-00-4], GSH [ $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ , CAS# 70-18-8], TBA [ $C_4H_4N_2O_2S$ , CAS# 504-17-6], TCA [ $C_2HCL_3O_2$ , CAS# 76-03-9], phosphate di-sodique [ $Na_2HPO_4$ , CAS# 7558-79-4], phosphate mono-sodique [ $NaH_2PO_4$ , CAS# 7558-80-7], bleu de Coomassie [ $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$ , CAS# 6104-58-1], acide phosphorique(85%) [ $H_3PO_4$ , CAS# 7664-38-2], éthanol (95%) [ $C_2H_6O$ , CAS#64-17-5].

#### 3.2. Matériel biologique et traitement :

Quarante rats blancs mâles de la souche Wistar pesant ( $240,5 \pm 5,9$ ) g sont inclus dans notre étude. Ils ont reçu de l'institut Pasteur (Centre d'élevages El Kouba, Alger). Tous sont maintenus dans l'animalerie de notre université et soumis à une période d'adaptation de 30 jours aux conditions standards de la période de mois de novembre à décembre. Les rats étaient hébergés dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une sciure de bois nettoyées quotidiennement. Ils reçoivent un régime standard non enrichi en sélénium et vitamine E et

l'eau *ad libitum*. Cette nourriture est obtenu de l'ONEB (unité de bétail El Ksour ; Bejaïa, Algérie).

Après la période d'accoutumance, 32 rongeurs ont été répartis au hasard en quatre groupes de 08 rats chacun et reçu le traitement pendant 21 jour.

- **Groupe Témoin** : les rats ont reçu l'huile d'olive par gavage et soumis à un régime standard (RS).
- **Groupe (Se+Vit E)** : les rats ont reçu l'huile d'olive par gavage et soumis à un régime enrichi en sélénium et en vitamine E (RS/ (Se+Vit E).
- **Groupe BPA** : les rats ont été gavés par 10mg/kg du bisphénol A dissout dans l'huile d'olive et soumis à un régime standard (RS).
- **Groupe BPA/ (Se+Vit E)** : les rats ont été gavés par 10mg/kg du bisphénol A dissout dans l'huile d'olive et soumis à un régime enrichi en sélénium et en vitamine E (RS/ (Se+Vit E).

La prise alimentaire est contrôlée quotidiennement dans chaque groupe. De plus, les rats sont pesés trois fois par semaine pendant trois semaines.

### 3.3. Protocole expérimentale :

À la fin de l'étude, les rats sont sacrifiés par décapitation. Puis, le sang est immédiatement recueilli dans trois tubes étiquetés, l'un contient l'EDTA comme anticoagulant, le deuxième contient l'héparine comme anticoagulant et l'autre étant sec. Ces derniers sont centrifugés à 5000 tours/min pendant 15 minutes, les sérums obtenus ont été stockés au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse ultérieure des paramètres biochimiques (glucose, l'albumine, urée, créatinine, bilirubine, cholestérol, ch-LDL, ch-HDL, triglycérides, transaminases...) ainsi l'analyse hormonale (T3, T4, TSH, FSH et la testostérone). Alors que, les tubes à EDTA sont immédiatement analysés par un Coulter et la formule de numération sanguine (FNS) a été déterminée.

Après la dissection des rats, les organes (foie, rein et testicule) ont été récupérés, pesées et conservés soit dans le formol pour la réalisation des coupes histologiques, soit dans le congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant (GSH, MDA, GPx, GST et CAT).

Les différentes étapes de l'étude sont schématisées dans la figure 21.

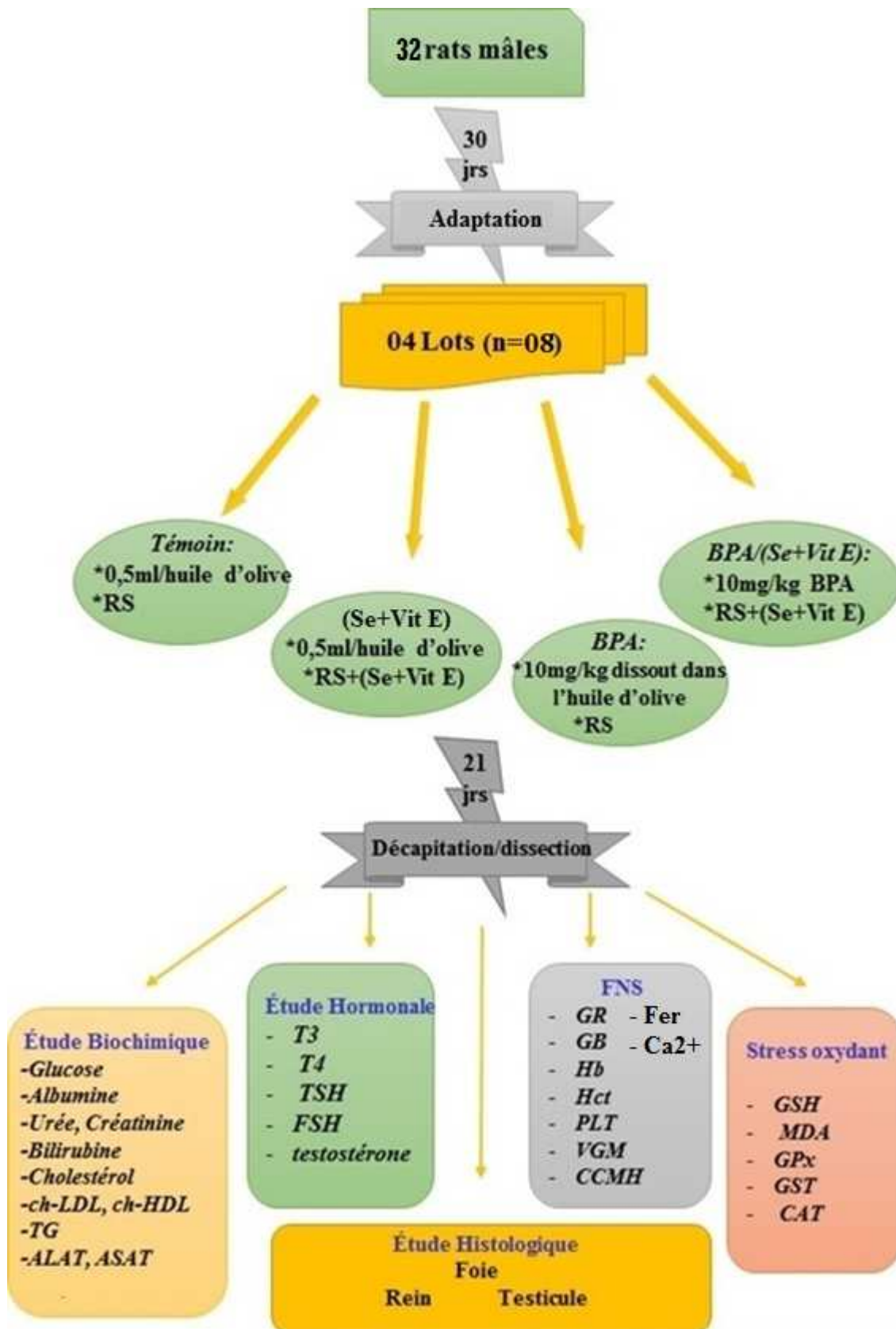


Figure 21. Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

### **3.4. Méthodes d'analyses :**

#### **3.4.1. Paramètres hématologiques :**

##### **\* FNS :**

La formule de numération sanguine (FNS) a été réalisée à l'aide d'un Coulter de model Abacus 4. Le tube EDTA contenant du sang est placé sur le porte tube au niveau de l'automate ; et la mesure de la FNS commence. Les résultats s'affichent automatiquement sur l'écran, et sont ensuite imprimés. Les paramètres déterminés sont : globule rouge (GR), globule blanc (GB), hémoglobine (Hb), hématocrite (HCT), plaquettes (PLT), lymphocytes (LY), monocytes (MO), volume globulaire moyen des hématies (VGM) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH).

##### **\* Principe de dosage du fer :**

Après rupture de la liaison fer-transferrine et déprotéinisation par l'acide chlorhydrique et l'acide trichloracétique, le fer  $Fe_3^+$  est réduit par l'acide thioglycolique en fer  $Fe_2^+$ . Les ions  $Fe_2^+$  forment ensuite un complexe coloré avec la bathophénanthroline disulfonée. La coloration mesurée à 535 nm (520-550 nm) est directement proportionnelle à la concentration en fer dans le milieu réactionnel.

##### **\* Principe de dosage du calcium :**

La méthode CPC permet de déterminer la concentration en Calcium total dans le sérum, le plasma ou les urines. En milieu alcalin, le 0-crésolphtaléine complexon ou CPC réagit avec les ions calcium pour former un complexe coloré rouge foncé dont l'absorbance, mesurée à 570 nm, est proportionnelle à la concentration en calcium dans le spécimen.

#### **3.4.2. Paramètres biochimiques :**

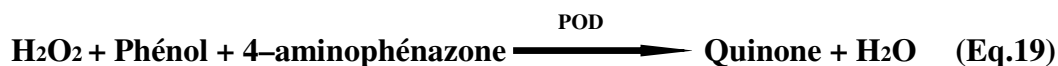
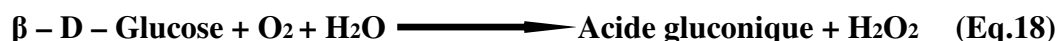
L'analyse des différents paramètres biochimiques a été réalisée à l'aide d'un automate biochimique suivant la fiche technique Spinreact (détaillée dans l'annexe).

##### **3.4.2.1. Exploration de la fonction hépatique**

###### **A. Principe de dosage de la glycémie :**

Le glucose est transformé par le glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Eq.18). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), oxyde le

chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge-violet (quinoneimine) (Eq.19) (Kaplan, 1984), selon les réactions suivantes :



### B. Principe de dosage de l'Albumine :

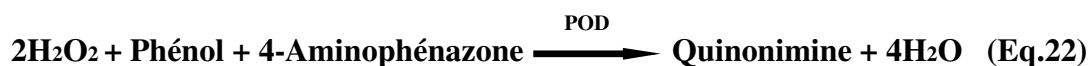
L'albumine présente dans l'échantillon réagit avec le vert de bromocrésol en milieu acide, en donnant lieu à un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie.

### C. Principe de dosage de la bilirubine directe :

La bilirubine réagit avec l'acide sulfanilique diazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine. Cette réaction est instantanée avec la bilirubine directe (la bilirubine conjuguée), par contre avec la bilirubine totale (bilirubine non conjuguée) elle est indirecte nécessite la solubilisation par le diméthylsulfoxyde (DMSO) (En absence de DMSO, seule la bilirubine directe réagit). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon (Kaplan et al, 1984).

### D. Principe de dosage du cholestérol :

Le cholestérol présent dans l'échantillon forme un complexe coloré (Naito, 1984) selon les réactions ci-dessous :



### E. Principe de dosage du cholestérol HDL :

Les chylomicrons et les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et de faible densité (LDL) contenus dans l'échantillon sont précipités par l'addition d'acide phosphotungstique en présence d'ions magnésium. Un surnageant obtenu après

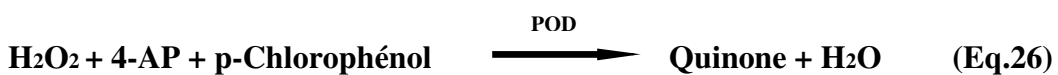
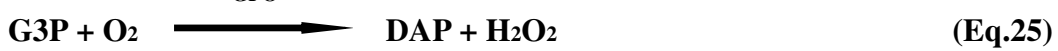
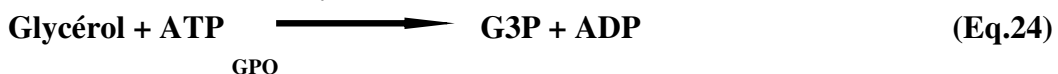
centrifugation contient les lipoprotéines de haute densité (HDL) dont le cholestérol est dosé par le réactif cholestérol enzymatique.

**F. Principe de dosage du cholestérol LDL :**

Au cours de la première phase, seules les lipoprotéines non-LDL sont solubilisées par le 4-amino-antipyrine. Le cholestérol ainsi généré, soumis à l'action du cholestérol Oxydase (CO) et du cholestérol Estérase (CE), produit un composé incolore. Au cours de la seconde phase, le Tampon MES (pH 6,3) solubilise le cholestérol- LDL. Le couple chromogénique développe une réaction colorée proportionnelle à la concentration en cholestérol-LDL. La lecture s'effectue à 546 nm.

**G. Principe de dosage des triglycérides :**

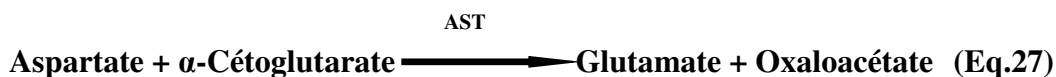
L'incubation des triglycérides de l'échantillon avec la lipoprotéinlipase (LPL) libère le glycérol et des acides gras. Le glycérol est convertit en glycérol-3-phosphate (G3P) et adénosine diphosphate (ADP) par le glycérol kinase et l'ATP. Le glycérol-3-phosphate (3GP) est ensuite convertit par le glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (LPL). Dans la réaction finale, le peroxyde d'hydrogène réagit avec 4-aminpphénazone (4-AP) et le p-chlorophénol en présence de peroxydase (POD) pour donner une couleur verte (Kaplan et al, 1984).



**H. Principe de dosage des transaminases plasmatiques :**

**\* Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT) :**

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi l'oxaloacétate de glutamate transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α-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 :



**\* Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT) :**

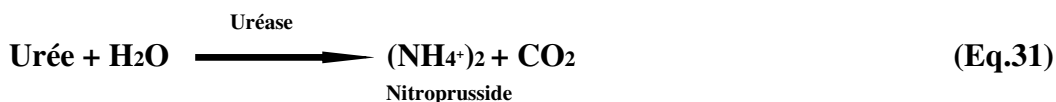
L'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi le pyruvate de glutamate transaminase (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au  $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et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



**3.4.2.2. Exploration de la fonction rénale :**

**A. Principe de dosage de l'urée :**

L'urée est hydrolysée enzymatiquement en ions d'ammoniac (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Les ions d'ammoniac formés réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite (NaClO) en présence du catalyseur nitroprusside pour former l'indophénol vert (Kaplan, 1984), selon les réactions suivantes :



**B. Principe de dosage de la créatinine :**

La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe coloré, mesuré dans un intervalle de temps défini et proportionnel à la concentration en créatinine de l'échantillon (Murray, 1984)

**3.4.2.3. Exploration de la fonction thyroïdienne :**

**A. Principe de dosage de la thyroxine libre (FT4) :**

La thyroxine (T<sub>4</sub>) est sécrétée par la thyroïde sous l'influence de la TSH. Elle est converti en T<sub>3</sub> dans le sang (T<sub>4</sub>= forme de réserve des hormones thyroïdiennes). La T<sub>4</sub> est majoritairement liée à la thyroxine binding globulin TGB en circulant dans le sang.

Le principe du dosage associe la méthode immuno-enzymatique par compétition à une détection finale en fluorescence (Enzyme Linked immunosorbent Assay, ELISA).

**B. Principe de dosage de la triiodothyronine T3 :**

La triiodothyronine (T3) sécrétée par la thyroïde et elle aussi liée à les TGB. Cette hormone présente une action plus puissante que la T4.

Le principe du dosage associe la méthode immuno-enzymatique par compétition à une détection finale en fluorescence (Enzyme Linked immunosorbent Assay, ELISA).

**C. Principe de dosage de la TSH :**

La TSH est sécrétée par l'hypophyse et stimule la sécrétion des hormones thyroïdiennes.

Le principe du dosage associe la méthode immuno-enzymatique par compétition à une détection finale en fluorescence (Enzyme Linked immunosorbent Assay, ELISA).

**3.4.2.4. Exploration de la fonction reproductrice :**

**A. Principe de dosage de la LH :**

L'hormone lutéinisante (LH) est sécrétée par l'anté-hypophyse. Elle fait partie des gonadotrophines : elle contrôle, avec d'autres hormones, les glandes sexuelles (gonades). Chez le mâle, elle stimule les cellules de Leydig à l'origine de la sécrétion de testostérone. Chez la femelle, c'est précisément le pic de LH qui va déclencher l'ovulation lors d'une série de réactions en chaîne.

Le principe du dosage associe la méthode immuno-enzymatique par compétition à une détection finale en fluorescence (Enzyme Linked immunosorbent Assay, ELISA).

**B. Principe de dosage de la testostérone :**

La testostérone est une hormone stéroïdienne sécrétée par les testicules sous le contrôle de LH. Elle intervient dans le développement sexuel des individus.

Le principe du dosage associe la méthode immuno-enzymatique par compétition à une détection finale en fluorescence (Enzyme Linked immunosorbent Assay, ELISA).

### 3.4.5. Les Paramètres du stress oxydant :

#### 3.4.5.1. Préparation de l'homogénat

Un gramme de foie, rein ou du cerveau de rats des différents groupes étudiés, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans la TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM, pH 7.4), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, 4°C, 15 min), puis le surnageant obtenu est versé dans des tubes eppendorfs puis conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydant.

#### 3.4.5.2. Dosage des protéines totales :

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

#### *Mode opératoire :*

- ✚ Prélever 0.1 ml de l'homogénat.
- ✚ Ajouter 5 ml du bleu de Coomassie.
- ✚ Agiter et laisser reposer 5 minutes.
- ✚ Lire à 595 nm les densités optiques contre le blanc

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions (Fig.22).

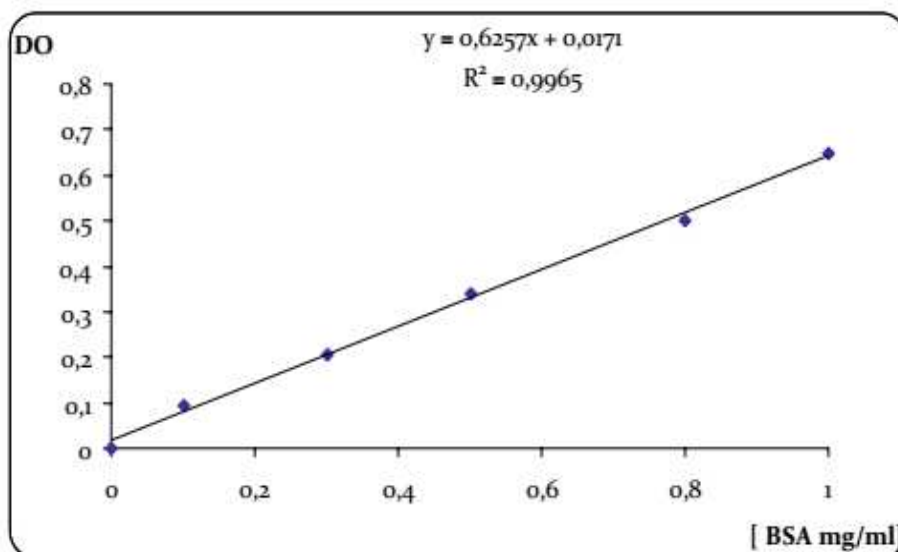


Figure 22. La gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.

### 3.4.5.3. Principe de dosage du taux de malondialdéhyde (MDA) :

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) méditées par les radicaux libres. Le niveau de peroxydation lipidique a été évalué en mesurant le malondialdéhyde avec le test TBARS (Thiobarbituric reactive species) (Buege et Aust., 1972).

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.

#### *Mode opératoire :*

- ✚ Prélever 375 µl de l'homogénat (surnageant).
- ✚ Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- ✚ Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)
- ✚ Vortexer et Centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min.
- ✚ Prélever 400 µl du surnageant.
- ✚ Ajouter 80 µl du HCl 0.6 M.
- ✚ Ajouter 320 µl de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM).
- ✚ Mélanger et incubé au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.

La densité optique a été enregistrée à  $\lambda = 530$  nm. L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ( $DO = E.C.L$ ) :

$$C \text{ (nmol/mg protéine)} = \frac{DO \times 10^6}{\epsilon \times L \times \chi \times Fd}$$

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

#### 3.4.5.4. Principe de dosage du taux du glutathion réduit (GSH) :

Le glutathion est un thiol intracellulaire le plus abondant présent dans toutes les cellules animales. Leur principe de dosage consiste à couper la molécule d'acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) qui présente une absorbance à 412 nm (*Ellman., 1959*).

##### *Mode opératoire :*

- ✚ Prélever 0.8 ml de l'homogénat.
- ✚ 0.2 ml 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 5 min.
- ✚ Prélever 0.5 ml du surnageant.
- ✚ Ajouter 1 ml du tampon Tris, pH 9.6.
- ✚ Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB)  
à  
0.01 M.

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

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH (nmol GSH /mg protéine)} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13.6 \times 0.8 \times \text{mg protéine}}$$

- DO : Densité optique.
- 1 : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8ml homogénat + 0.2 ml de l'acide salicylique).
- 1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant+1 ml Tris + 0.025 ml DTNB)
- 13.6 : Coefficient d'absorbance du groupement –SH à 412 nm.
- 0.8 : Volume de l'homogénat.
- 0.5 : Volume du surnageant.

#### 3.4.5.5. Principe de dosage de l'activité enzymatique

##### A/ Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) :

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) a été calculée par la diminution de taux de GSH réduit par rapport à la réaction non enzymatique « blanc » (Flohe et Gunzler, 1984).



##### Mode opératoire :

- ✚ Prélever 0.2 ml de l'homogénat (surnageant).
- ✚ Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM).
- ✚ Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4)
- ✚ Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
- ✚ Ajouter 0.2ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- ✚ Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.

- ✚ Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- ✚ Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- ✚ Prélever 0.48 ml du surnageant.
- ✚ Ajouter 2.2 ml de la solution tampon TBS.
- ✚ Ajouter 0.32 ml de DTNB (1.0 mM)
- ✚ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 41.2 nm

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{GPx } (\mu\text{mol GSH/mg protéine}) = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0.04}{\text{DO étalon}} \times \frac{5}{\text{mg protéine}}$$

- DO échantillon : Densité optique de l'échantillon.
- DO étalon : Densité optique de l'étalon.
- 0.04 : Concentration de substrat (GSH)

### **B/ Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST)**

Les glutathion S-transférases catalysent des réactions de conjugaison entre un peptide endogène, le glutathion, et des molécules réactives comportant des sites électrophiles. L'activité de la GST est mesurée suivant la cinétique de formation entre un substrat modèle, le chlorodinitrobenzene (C-DNB) et le glutathion (à une température de 37°C et à un pH de 6.5), qui absorbe la lumière à 340 nm (*Habig et al., 1974*).

#### **Mode opératoire :**

- ✚ Mettre 830 µl du tampon phosphate (0.1M) pH 6.5
- ✚ Ajouter 50µl CDNB (0.02M)
- ✚ Ajouter 100µl GSH (0.1M)
- ✚ Ajouter 20µl d' Homogénat.

La variation de la densité optique est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes.

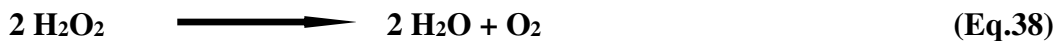
La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST (nmol GST/min/mg protéine)} = \frac{\text{DO échantillon/min} - \text{DO blanc/min}}{9.6 \times \text{mg protéine}}$$

- Do : Densité optique de l'échantillon /min.
- Do/min blanc : Densité optique du blanc /min
- 9.6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM. Cm.

### C/ Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### **Mode opératoire :**

- ✚ Mettre 780µl Tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4).
- ✚ Ajouter 200µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- ✚ Ajouter 20µl d'homogénat.

La lecture de l'absorbance se fait à 240 nm après 15 secondes de délai et durent 60 secondes de mesure.

### **3.4.6. Technique Histologique :**

Les coupes histologiques ont été réalisées suivant la technique classique de Houlot (1984) :

**A. Fixation :**

Des fragments de foie, rein, testicule et cerveau de chaque rat sont mis dans un Bouin alcoolique. Après 48 heures de fixation, les organes sont retirés du Bouin puis rincées à l'eau distillée. Des coupes transversales ont été faites et placés dans des cassettes spéciales à parois trouées afin de permettre le passage des liquides au cours des manipulations qui se suit.

**B. Déshydratation :**

Comme la paraffine n'est pas miscible à l'eau, les échantillons doivent être alors complètement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. Cette dernière n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation, on assiste donc à une substitution par le xylène. La déshydratation se fait grâce à un automate qui fait immerger les échantillons dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70, 90 et 100 %), puis dans des bains de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu une certaine transparence. Ensuite, dans l'étuve le xylène s'évapore des pièces anatomiques. Cette étape est réalisée par un appareil appelé le circulateur.

**C. Inclusion :**

Après la déshydratation complète des tissus, ils sont alors plongés dans des bains de paraffine liquide fondue à 60°C. Les tissus étant maintenu et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion » refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu.

**D. Confection des Coupes :**

Les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir des coupes au microtome de 4 à 5 µm. Les coupes sériées sont étalées et fixées sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée. Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis dépliés et fixés par une eau gélatineuse chauffée à 40 °C. Les lames sont marquées au nom des différents lots à l'aide d'un crayon d'argent, ensuite séchées dans une étuve à 100 °C pendant 1 heure.

### E. Coloration et Montage :

La méthode de l'Héματοxyline-Eosine HE (ou Hématéine-Eosine) est la plus utilisée. La coloration suit les étapes suivantes :

- ✚ Déposer les coupes dans un bain de xylène pendant 10 minutes afin de déparaffiner les échantillons et faire pénétrer les colorants.
- ✚ La réhydratation des coupes se fait par passage dans un bain d'éthanol pendant 10 minutes puis hydrater les lames par l'eau du robinet
- ✚ Immerger les coupes dans un bain d'Hématéine (10 minutes) qui colore en bleu violacé les structures basophiles (noyaux cellulaires). Rincer à l'eau courante.
- ✚ Le deuxième colorant utilisé est l'éosine qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasmes cellulaires). Rincer à l'eau courante.

Le montage consiste à fixer une lamelle en verre sur les coupes histologiques après coloration. Cette étape permet la :

- ✚ protection mécanique des coupes.
- ✚ protection chimique des colorants.
- ✚ Sécher les lames puis observer au microscope optique équipé d'un appareil photographique.

### 3.5. Analyse Statistique :

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins l'écart type moyen ( $M \pm SEM$ ). Ces moyennes sont comparées par un test *ANOVA* One Way suivi par le test post hoc de *tukey*. Cette analyse statistique est obtenue à l'aide du logiciel MINITAB (version 16). Les différences sont considérées significatives à  $p < 0,05$ .



*Chapitre IV*

**4. Résultats et discussion :**

**4.1. Impact du bisphénol A sur quelques paramètres physiologiques : effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et en vitamine E**

**4.1.1. Évolution pondérale, prise alimentaire et rapports organo-corporels :**

❖ **Analyse des résultats :**

Au cours du suivi des rats avec la dose de 10mg/kg du BPA pendant les trois semaines, nous avons constaté une augmentation de la masse corporelle dans les quatre groupes. Cependant, cette prise corporelle a été plus importante chez le groupe traité par le bisphénol A que chez les autres groupes (Fig.23). Les rats soumis sous traitement uniquement du BPA présentent un pourcentage de gain du poids plus élevé (18.99%). Cependant, l'ajout des antioxydants (Se+Vit E) au régime des rats traités par le BPA a diminué significativement leur poids corporel par rapport aux rats traités seulement par le BPA. Curieusement, la prise alimentaire a été diminuée de façon significative chez les rats du troisième et quatrième groupe [BPA ; BPA/ (Se+Vit E)] par rapport aux rats témoins (Tab.13).

**Tableau 13. Variation corporelle, rapports organo-corporels et la prise alimentaire chez les rats de différents groupes.**

Paramètres	Témoin	(Se +Vit E)	BPA	BPA/(Se+ Vit E)
<b>Poids corporel Initial (g)</b>	275.67± 4.19 <sup>a</sup>	271.83±2.91 <sup>a</sup>	270.25±2.51 <sup>a</sup>	270.5±2.310 <sup>a</sup>
<b>Poids corporel Final (g)</b>	299.71±5.94 <sup>b</sup>	310.62±6.91 <sup>b</sup>	345.50±9.40 <sup>a</sup>	291.75 ±5.30 <sup>b</sup>
<b>Gain du poids (%)</b>	8.16±2.35 <sup>b</sup>	8.87±1.51 <sup>b</sup>	18.99±2.03 <sup>a</sup>	3.80+2.13 <sup>b</sup>
<b>Prise alimentaire (g/jr/rat)</b>	19.74±0.77 <sup>a</sup>	21.69±0.90 <sup>a</sup>	17.62±1.01 <sup>b</sup>	17.09±2.69 <sup>b</sup>

\* Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes (p<0.05)

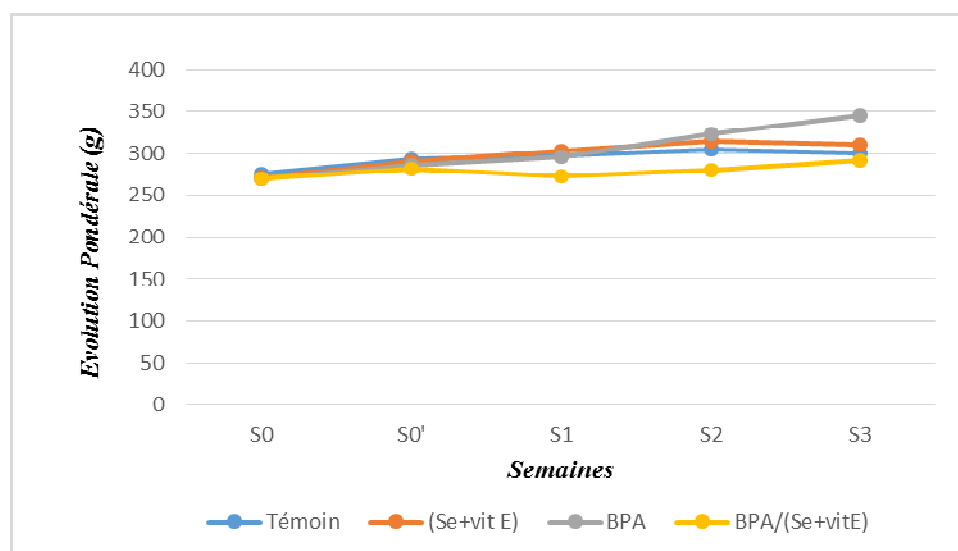


Figure 23. Évolution Ponderale (g) chez les rats de différents groupes durant la période d'expérimentation.

D'autre part, aucun changement n'a été enregistré au niveau du poids relatif des différents organes (foie, reins, testicules) entre les quatre groupes. De même, le poids absolu des trois organes (foie, testicules et cerveau) n'a pas montré aucune variation entre les quatre groupes. Cependant, le poids absolu des reins a été évolué significativement chez les rats traités seulement par le BPA ainsi chez les rats administrés le BPA concomitant avec les antioxydants (Se+Vit E) par rapport aux témoins (Tab.14).

Tableau 14. Variation du poids absolu (P.A) (g) et relatif (P.R) (g/100g de PC) du foie, reins, testicules et cerveau chez les rats de différents groupes.

Paramètres	Témoin	(Se+Vit E)	BPA	BPA/(Se+Vit E)
P.A du foie (g)	8.12±0.58 <sup>a</sup>	7.92 ± 0.36 <sup>a</sup>	8.37 ± 0.35 <sup>a</sup>	8.28 ± 0.29 <sup>a</sup>
P.R du foie (g/100g.p.c)	2.60±0.10 <sup>a</sup>	2.70±0.10 <sup>a</sup>	2.93±0.10 <sup>a</sup>	2.63±0.05 <sup>a</sup>
P.A du rein (g)	0,70±0,02 <sup>a</sup>	0,75±0,02 <sup>a</sup>	1,01±0,05 <sup>b</sup>	0,89±0,02 <sup>b</sup>
P.R du rein (g/100g.p.c)	0,30±0,01 <sup>a</sup>	0,30±0,01 <sup>a</sup>	0,27±0,01 <sup>a</sup>	0,29±0,01 <sup>a</sup>
P.A du testicule (g)	1,44±0,08 <sup>a</sup>	1,52±0,06 <sup>a</sup>	1,45±0,10 <sup>a</sup>	1,51±0,032 <sup>a</sup>
P.R du testicule (g/100g.p.c)	0,45±0,03 <sup>a</sup>	0,51±0,013 <sup>a</sup>	0,48±0,04 <sup>a</sup>	0,53±0,01 <sup>a</sup>
P.A du cerveau (g)	1,30±0,06 <sup>a</sup>	1,27±0,03 <sup>a</sup>	1,26±0,07 <sup>a</sup>	1,31±0,04 <sup>a</sup>
P.R du cerveau (g/100g.p.c)	0,41±0,02 <sup>a</sup>	0,42±0,01 <sup>a</sup>	0,41±0,03 <sup>a</sup>	0,46±0,02 <sup>a</sup>

\* Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes (p<0.05)

### ❖ Discussion :

En raison de l'omniprésence du bisphénol A dans notre vie quotidienne, sa migration du récipient vers son contenu est mise en doute. Le phénomène est augmenté par la température ou la nature grasse du contenu (*Vandenberg et al., 2007*). Des études épidémiologiques antérieures ont mis en évidence une corrélation positive entre le taux urinaire du BPA et la prise corporelle des individus humains (*Shankar et al., 2012 ; Trasande et al., 2012*). Ces observations sont en accord avec nos résultats d'où on a trouvé un surpoids significatif chez les rats administrés 10mg/kg p.c. De plus, des études ont trouvé que l'administration du BPA durant les périodes prénatale et néonatale chez les rongeurs résulte d'une augmentation du poids corporel des progénitures particulièrement chez les femelles (*Rubin et al., 2001 ; Somm et al., 2009*). En effet, Rubin et ses collaborateurs montrent que le BPA a augmenté le poids corporel chez la progéniture femelle et male nés de mères exposées au BPA (0.1 mg- 1.2 mg/kg p.c.), bien que l'augmentation persiste plus longtemps chez les femelles. De plus, chez la progéniture femelle, la plus faible des deux doses de BPA produit un effet plus important et plus persistant sur le poids corporel par rapport à la dose plus élevée (*Rubin et al., 2001*). Auparavant, Masuno (2005) a découvert que le BPA pouvait déclencher la différenciation des cellules 3T3-L1 dans les adipocytes (composant cellulaire principal du tissu adipeux). Il a conclu que le BPA agissait via la voie PI 3-kinase et Akt kinase, entraînant une augmentation de l'accumulation de TG (triacylglycerol) et l'expression des gènes des adipocytes en accélérant la différenciation terminale des cellules 3T3-L1). Cette voie est la même impliquée par l'insuline, un agent adipogène.

Plus loin, il est connu que les hormones thyroïdiennes régulent l'hémostasie d'énergie corporelle, À l'état hyperthyroïdien, la thermogénèse, et donc le taux métabolique basal, augmente et le poids corporel a une tendance à diminuer (*Vanderpump et al., 1996*). Néanmoins, un hypothyroïdisme est en dépendance d'un gain du poids avec une diminution de la dépense énergétique au repos (REE) (*Kim., 2013*). Des taux de T4 étaient élevés chez les petits animaux traités au BPA, mais les niveaux de TSH n'étaient pas différents de ceux observés chez les témoins (*Zoeller et al., 2005*). Ces résultats reflètent un profil endocrinien similaire à celui observé dans le syndrome de résistance thyroïdienne (*Cheng., 2005*). Par contre, l'étude de Meeker et son équipe (2010) ont enregistré une relation inverse entre la concentration du BPA urinaire et le taux du T4 et TSH circulant chez des patients d'une clinique d'infertilité. D'ailleurs, lorsqu'il a été administré à des doses élevées (4 or 5 mg/j) pendant 15 jours à des rats, le BPA a entraîné une réduction du poids corporel et une prise

alimentaire réduite (Nunez et al., 2001), tandis que d'autres ont découvert que l'administration de BPA à des rats pendant trois mois ne modifiait pas le poids corporel ou le taux des triglycérides (Seidlova-Wuttke et al., 2005).

Ces dernières années, la vitamine E et le sélénium préoccupent un intérêt croissant pour la régulation et la correction des défauts morphologiques et physiologiques induits par les xénobiotiques. La vitamine E est connue en tant qu'un antioxydant protecteur de la membrane cellulaire qui protège la cellule des radicaux hydroxyles et alkoxyes. Le sélénium, un minérale de trace, agit en tant qu'un cofacteur pour les sélénoprotéines. C'est ainsi qu'en expérimentation animale, elle révèle des effets hypocholestérolémiants. Des études ont conseillées de prendre la vitamine E et le sélénium ainsi leurs apports ensemble au cours d'un régime pour le maintien de la fitness pour les hommes (Combs et Scott., 1981 ; Astfalk., 2011). Des hommes sains ont reçu 47 $\mu$ g/j pendant 21 jours. Après, ils ont divisé en deux groupes : le premier a reçu 14 $\mu$ g/j, le deuxième a reçu 297 $\mu$ g pendant 99 jours. Dans le groupe à faible teneur en sélénium, les augmentations des taux sériques de T3 et des triacylglycérols sériques, accompagnées de pertes de graisse corporelle, suggèrent qu'une réponse hypothyroïdienne était induite par un régime alimentaire faible en sélénium. Alors qu'une prise corporelle significative a été enregistrée chez le deuxième groupe (Hawkes et Keim., 2003). Par contre, des rats traités au Se ont montré une diminution significative de la masse du grasse abdominale, des adipocytes et de l'adiponectine, qui sont associées au métabolisme des lipides. Ainsi, le tissu adipeux présentait une expression significativement plus faible des gènes marqueurs des adipocytes (Kim et al., 2012). D'autre part, des rats ayant un régime alimentaire déficient en vitamine E pendant 28 jours ont présenté une réduction significative du poids corporel et de l'apport alimentaire. Une supplémentation en vitamine E à 60 mg/kg p.c. n'était pas suffisante pour prévenir les changements de poids corporel ou d'ingestion de nourriture (Fahami et al., 2005).

Après la glucuronisation dans le foie, le BPA est rapidement éliminé par les reins (70% à 90% BPA- glucuronide) (Tsukioka et al., 2004), avec une demi-vie dans le sang inférieure à 2 heures après l'ingestion orale, ce qui se traduit généralement par une baisse de son taux sanguin. En revanche, chez les patients présentant une insuffisance rénale, l'excrétion urinaire du BPA semble diminuer, permettant son accumulation (Murakami et al., 2007 ; You et al., 2011). Alors, la variation enregistrée au niveau du poids absolu des reins peut être due à l'accumulation des métabolites non seulement du BPA mais aussi de la vitamine E et du sélénium.

#### 4.2. Impact du bisphénol A sur les paramètres hématologiques : effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et en vitamine E

❖ Analyse des résultats :

Nos résultats ne montrent aucun changement dans les différents paramètres de la formule de la numération sanguine chez les différents groupes. Seulement, une baisse significative de l'hématocrite a été enregistrée chez les rats traités par le BPA par rapport aux autres rats. De plus, le taux de l'hémoglobine est augmenté de manière significative chez les mêmes rats ainsi les rats administrés par le BPA et le (Se+Vit E) par rapport aux rats témoins.

Tableau 15. Variation de taux du quelques paramètres hématologiques chez les rats de différents groupes.

Paramètres	Témoin	(Se +Vit E)	BPA	BPA/(Se+ Vit E)
GR (10 <sup>12</sup> /l)	8.01±0.11 <sup>a</sup>	8.99±0.23 <sup>a</sup>	8.01±0.29 <sup>a</sup>	8.68±0.18 <sup>a</sup>
HCT (%)	44.94±0.89 <sup>a</sup>	43.84±0.97 <sup>a</sup>	35.63±0.73 <sup>b</sup>	43.58±0.42 <sup>a</sup>
Hb (g/dl)	135.43±2.05 <sup>b</sup>	138.86±2.60 <sup>b</sup>	147.71±2.02 <sup>a</sup>	143.14±2.95 <sup>a,b</sup>
GB (10 <sup>9</sup> /l)	4.72±0.43 <sup>b</sup>	4.88±0.19 <sup>a</sup>	6.29±0.26 <sup>a</sup>	5.50±0.31 <sup>a</sup>
Lym (10 <sup>9</sup> /l)	4.94±0.45 <sup>a</sup>	5.23±0.69 <sup>a</sup>	5.63±0.49 <sup>a</sup>	5.77±0.22 <sup>a</sup>
Eos (10 <sup>9</sup> /l)	0.09±0.01 <sup>a</sup>	0.09±0.02 <sup>a</sup>	0.11±0.03 <sup>a</sup>	0.10±0.02 <sup>a</sup>
Plts (10 <sup>9</sup> /l)	630.40±16.90 <sup>a</sup>	592.43±14.15 <sup>a</sup>	610.43±14.02 <sup>a</sup>	597.60±12.90 <sup>a</sup>
MCV (fl)	49.00±1.29 <sup>a</sup>	48.28±0.63 <sup>a</sup>	46.85± 1.19 <sup>a</sup>	46.420±0.429 <sup>a</sup>
MCH (pg)	15.78±0.27 <sup>a</sup>	15.97±0.42 <sup>a</sup>	15.31±0.22 <sup>a</sup>	15.250±0.241 <sup>a</sup>
MCHC (g/l)	322.14±6.92 <sup>a</sup>	332.71±8.22 <sup>a</sup>	317.57±6.24 <sup>a</sup>	330.860±2.430 <sup>a</sup>
Fer (µg/dl)	125.01±14.02 <sup>a</sup>	126.02±12.6 <sup>a</sup>	125.59±14.25 <sup>a</sup>	124.03±12.56 <sup>a</sup>
Ca <sup>2+</sup> (mM/l)	1.03±0.02 <sup>a</sup>	1.10±0.01 <sup>a</sup>	0.99±0.02 <sup>a</sup>	1.12±0.02 <sup>a</sup>

\* Les moyennes ne partagent aucune lettre sont significativement différentes (p<0.05)

### ❖ Discussion :

La diminution du taux de l'hématocrite et l'augmentation du taux d'hémoglobine est toujours liée à une anémie hémolytique (*Larousse Médicale.*, 1988). Cependant, aucune étude publiée n'a annoncé une relation entre le BPA et l'anémie. Seulement, une étude égyptienne menée par Ahmed et ses collaborateurs (2015) ont reporté une diminution significative des érythrocytes, le taux de l'Hb et l'Hct ; syndromes d'une anémie normocytaire. De plus, une diminution légère de taux des globules blanc avec une augmentation aussi légère statistiquement non significative a été enregistrée chez des rats mâles et femelles après l'injection intrapéritonéale des doses croissantes du BPA (0.05, 0.5 et 5 mg/kg p.c) (*Park et al.*, 2004). On peut lier l'effet exercé par le bisphénol A sur les cellules hématologique à la génération des espèces réactives de l'oxygènes par cette molécule détruisant ainsi leurs membranes cellulaires. Autrement, les malades souffrants de la stéatose ou de la cirrhose hépatique ont été diagnostiqués par ses symptômes. Dans la littérature antérieure, le BPA entraîne une accumulation des graisses au niveau du foie ce qui lui donne le nom : foie gras non alcoolique (*ENDO.*, 2017).

En outre, la vitamine E et le sélénium joue un rôle majeur dans la protection des cellules contre les radicaux libres induits par différents polluants. Silva et son équipe (2017) a étudié l'effet de la présence et l'absence de la vitamine E sur des cellules sanguines préservées à 4°C pour 35 jours. Ils ont observé la diminution du taux généré des ROS au niveau des GR ainsi leur protection à long terme. On outre, l'administration de (1 µg/kg p.c) du sélénium préserve la capacité antioxydante des érythrocytes chez des rats mis sous un régime riche en cholestérol. Par contre, une dose élevée de (50µg/kg p.c) du sélénium entraîne une hémolyse des érythrocytes (*Harisa et al.*, 2013). Autrement, Messarah (2012) a reporté que la vitamine E diminue les ROS au niveau des érythrocytes après une administration de diazinon au rats. L'activité enzymatique antioxydante a été rétablie suivant la supplémentation en vitamine E.

### **4.3. Hépatotoxicité induite par le bisphénol A : effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et en vitamine E**

#### **4.3.1. Action sur quelques paramètres sériques de la fonction hépatique :**

##### **❖ Analyse des résultats :**

Une augmentation de la concentration des paramètres de l'énergie : glucose, cholestérol, LDL-ch et les triglycérides a été enregistrée chez les rats après une administration du BPA (Tab.16). Cependant, la concentration de l'HDL-ch et le taux de l'albumine ont subi une diminution significative chez les mêmes rats par rapport aux rats des autres groupes. De plus, les enzymes de la fonction hépatique (ASAL et ALAT) ont enregistré une activité élevée de manière significative chez les rats traités par ce xéno-œstrogène. Ainsi, la concentration de la bilirubine totale est supérieure de celle des autres groupes avec le maintien de la concentration de la bilirubine directe sans changement.

D'autre part, l'ajout des antioxydants (Se+Vit E) au régime des rats traités par le BPA a amélioré le déséquilibre de l'homéostasie induit après l'administration de ce monomère. La concentration du cholestérol, LDL-ch et TG a été diminuée et comparable à celle obtenus chez les groupes témoin et (Se+Vit E). Bien que, l'HDL-ch et l'albumine ont subi une récupération de leurs concentrations normale. D'autre part, la concentration de la bilirubine totale a été diminuée légèrement ainsi que l'activité enzymatique de l'ASAT. Par contre, le taux du glucose et l'activité enzymatique de l'ALAT ont resté élevé.

Tableau 16. Variation de quelques paramètres biochimiques de la fonction hépatique chez les rats de différents groupes.

Paramètres	Témoin	(Se + Vit E)	BPA	BPA/(Se +Vit E)
Glucose (g/dl)	1.30±0.05 <sup>b</sup>	1.54± 0.07 <sup>b,a</sup>	1.65± 0.08 <sup>a</sup>	1.53± 0.08 <sup>a</sup>
Cholestérol (g/l)	0.98±0.07 <sup>b</sup>	0.89± 0.10 <sup>b</sup>	1.32±0.08 <sup>a</sup>	1.02±0.039 <sup>b</sup>
LDL-CH (g/l)	0.13±0.01 <sup>b</sup>	0.17±0.01 <sup>b</sup>	0.24±0.03 <sup>a</sup>	0.17±0.01 <sup>b</sup>
TG (g/l)	0.49±0.06 <sup>b</sup>	0.44±0.02 <sup>b</sup>	0.80±0.05 <sup>a</sup>	0.55±0.02 <sup>b</sup>
HDL-CH (g/l)	0.28±0.02 <sup>a</sup>	0.26±0,01 <sup>a</sup>	0.20±0.01 <sup>b</sup>	0.25±0.01 <sup>a</sup>
Albumine (g/l)	33.74±1.25 <sup>a</sup>	30.76±0.94 <sup>a</sup>	28.19±0.72 <sup>b</sup>	33.69±0.83 <sup>a</sup>
T-Bil (g/l)	2.11 ± 0.02 <sup>c</sup>	2.14± 0.04 <sup>c</sup>	2.49± 0.03 <sup>a</sup>	2.27± 0.12 <sup>b</sup>
D-Bil (g/l)	0.14±0.01 <sup>a</sup>	0.14±0.01 <sup>a</sup>	0.15±0.01 <sup>a</sup>	0.16±0.01 <sup>a</sup>
ALAT (U/L)	107.71± 3.78 <sup>b</sup>	124.29± 5.26 <sup>b</sup>	155.71± 5.15 <sup>a</sup>	131± 4.14 <sup>a</sup>
ASAT (U/L)	89.14± 4.38 <sup>c</sup>	93.29± 5.67 <sup>c</sup>	132.43± 6.09 <sup>a</sup>	115± 4.42 <sup>b</sup>

\* Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes (p<0.05)

#### 4.3.2. Action sur le taux du MDA, GSH et sur l'activité de quelques enzymes antioxydantes :

Après le gavage par 10 mg/kg p.c. du BPA, les rats ont présenté un taux élevé du MDA ; produit terminale de la peroxydation lipidique ; statistiquement significatif par rapport aux rats du groupe témoin ainsi du groupe (SE+vit E). Cependant, un taux diminué significativement du GSH hépatique est constaté chez les mêmes rats. Également, nos résultats obtenus montrent une diminution significative de l'activité enzymatique antioxydante suivant un traitement par le BPA. En effet, l'activité enzymatique de la glutathionne peroxydase, de la GST et de la catalase a été diminuée significativement au niveau du foie des rats traités par le BPA par rapport aux rats témoins (Tab.17).

D'autre part, la supplémentation en sélénium et en vitamine E a diminué la concentration du MDA hépatique chez le quatrième groupe (BPA/Se+ Vit E) mais elle reste un peu supérieure en comparant avec le témoin. Par contre, les antioxydants augmentent le taux de GSH hépatique de façon significative chez les rats traités par la combinaison (BPA/Se+Vit E) par rapport au rats traités seulement par le BPA. Pareillement, l'activité

enzymatique de la glutathionne peroxydase a été renforcée de façon significative suivant l'ajout de Se et Vit E au régime des rats traités par le BPA par rapport aux rats traités seulement par le BPA. D'ailleurs, ce renforcement est encore de façon significativement inférieure à l'activité enzymatique de la GPx enregistrée chez les rats témoins et les rats du groupe (Se+Vit E). De plus, une claire restauration de l'activité enzymatique de la GST a été enregistrée chez les rats du quatrième groupe accompagnée par une amélioration significative de l'activité enzymatique de la CAT par rapport au troisième groupe.

**Tableau 17. Variation du taux du MDA (nmol/mg prot), GSH (nmol/mg prot) et de l'activité de quelques enzymes antioxydantes au niveau du foie des rats de différents groupes.**

Paramètres	Témoin	(Se + Vit E)	BPA	BPA/(Se + Vit E)
MDA (nmol/mg prot)	0.89±0.047 <sup>b</sup>	0.87±0.048 <sup>b</sup>	1.25±0.12 <sup>a</sup>	0.99±0.05 <sup>a, b</sup>
GSH (nmol/mg prot)	141.10±14.20 <sup>a</sup>	130.42±2.98 <sup>a</sup>	93.02±4.99 <sup>b</sup>	124.84±7.57 <sup>a</sup>
Glutathionne peroxydase <sup>1</sup>	320.20±11.60 <sup>a</sup>	290.27±8.99 <sup>a</sup>	192.20±10.10 <sup>c</sup>	229.40±6.38 <sup>b</sup>
Glutathionne transférase <sup>2</sup>	15.48±0.41 <sup>a</sup>	15.31±0.27 <sup>a</sup>	7.37±0.25 <sup>b</sup>	13.21±0.55 <sup>a, b</sup>
Catalase <sup>3</sup>	120.52±5.61 <sup>a</sup>	125.60±4.56 <sup>a</sup>	95.06±5.94 <sup>b</sup>	115.19±6.24 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Glutathione peroxidase : nmol GSH/min/mg protein, <sup>2</sup> Glutathione transferase: nmol C-DNB/min/mg<sub>prot</sub>.

<sup>3</sup> Catalase : μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /min/mg<sub>prot</sub>.

\* Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes (p<0.05)

#### 4.3.3. Action sur la structure histologique du foie :

##### ❖ Analyse des résultats :

D'après les résultats présentés dans le tableau 18, l'histo-structure hépatique des rats traités par le BPA a montré une modification structurale non comparable à celle des rats témoins. En effet, une congestion de vaisseaux sanguins hépato portaux a été trouvée (flèche bleue) avec des endroits d'où les hépatocytes sont dégénérées (étoile). Outre, des infiltrations inflammatoires autour des veines portes centrales (flèche noire) et l'apparition des foyers nécrotiques (N). Cette modification anatomique du foie est présentée en état modéré vers un état sévère (Fig.24). Cependant, la supplémentation en (Se+Vit E) après le gavage des rats par le BPA a corrigé les changements anatomiques du parenchyme hépatique. Mais, une légère

congestion des vaisseaux sanguins et une légère infiltration inflammatoire a été enregistrée chez ces rats.

**Tableau 18. Comptage semi quantitatif des modifications histo-structurales au niveau du foie des rats de différents groupes.**

Paramètres	Groupes			
	Témoin	(Se +Vit E)	BPA	BPA/(Se+ Vit E)
Dégénération des hépatocytes	-	-	++	-
Congestion de vaisseaux sanguins hépatoportaux	-	-	++	+
infiltration inflammatoire	-	+	+++	+
Foyers nécrotiques	-	-	++	-

(-) Normale, (+) légère, (++) modérée, (+++) sévère

#### ❖ Discussion :

Les données sur l'impact du BPA sur le profil biochimique sont réduites. Une étude sur les hommes qui habitent au sud de l'Italie a reporté une corrélation positive entre la présence du BPA dans les urines des individus et l'augmentation significative du taux des TG et la résistance à l'insuline. De plus, ces individus ont présenté un taux élevé du Il-6 et TNF $\alpha$  des marqueurs inflammatoires liés à une obésité viscérale (Savastano et al., 2015). Helal et son équipe (2013) ont conclu une hypercholestéromie avec une augmentation significative de la concentration des lipides totaux, cholestérol, TG et LDL-ch. Cependant, une diminution significative de la concentration des protéines totales, l'albumine et HDL-ch a été constaté.

Une étude épidémiologique menée par The National Health and Nutritional Examination (NHANES) 2003-2008 aux Etats-Unis montre l'existence d'une corrélation entre l'augmentation des concentrations de BPA dans les urines et l'apparition du diabète chez 3967 participants (51,7% femmes) (Shankar et Teppala., 2011). Silver et ses collègues (2011) ont noté des résultats similaires. Ils ont également analysé les données regroupées des périodes de déclaration NHANES de 2003-2004, 2005-2006 et 2007-2008. Dans cette étude, le diabète était défini comme une hémoglobine A1c  $\geq$  6,5% ou par l'utilisation de médicaments antidiabétiques. Alonso-Magdalena et ses collègues (2010) ont testé l'effet de

10-100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$  à partir du jour gestationnel 9-15 ans chez des souris OF-1. La tolérance au glucose chez les mères enceintes a été évaluée au cours du jour 16-18 de la gestation, et les mères enceintes traitées au BPA ont présenté des écarts de glycémie plus élevés au cours d'un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale. Le suivi de la progéniture male après 4 mois d'exposition à une dose élevée du BPA (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ ) présentait des altérations de la tolérance au glucose. Ces auteurs suggèrent un dysfonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques avec une exposition à une dose élevée de BPA pendant la gestation (*Alonso-Magdalena et al., 2010*). Le transport du glucose dans le foie nécessite la présence du GLUT2 pour permettre un équilibre physiologique rapide du taux du glucose intracellulaire et extracellulaire (*Rencurel et al., 1996*). Une augmentation significative de la protéine GLUT2 membranaire dans le foie des groupes traités au BPA a été montrée par (*Sahnkar et al., 2013*) associée à une hyperinsulinemia mais aucun changement du taux du glucose n'a été enregistré.

D'ailleurs, Chez des souris mâles adultes, l'exposition au BPA via des injections sous-cutanées (pendant 8 jours), à des doses relativement faibles (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  PC/j) diminue le métabolisme énergétique ce qui se traduit par une déficience dans la signalisation d'insuline au niveau périphérique (surtout au niveau musculaire). Le poids corporel n'a pas été affecté alors qu'on observe une diminution de prise de nourriture, une diminution de la température corporelle et de l'activité locomotrice, ce qui laisse penser que le BPA peut être considéré comme un facteur de risque dans le développement du diabète (*Batista et al., 2012*).

D'autre part, une nouvelle preuve montre la capacité des faibles doses de BPA à induire le syndrome métabolique, en particulier la NAFLD (Nonalcoholic fatty liver disease = Stéatose hépatique non alcoolique). Un dysfonctionnement significatif au niveau mitochondrial, notamment la production de ROS mitochondriales et l'hyperpolarisation ont été enregistrés. Ces événements sont associés à une accumulation de lipides dans la cellule, à une lipo-péroxydation (LPO) et à la libération des cytokines pro-inflammatoires : Interleukin-8 (IL-8) et le facteur de nécrose tumorale alpha ( $\text{TNF}\alpha$ ) (*Huc et al., 2012*). IL6, IL8 et  $\text{TNF}\alpha$  sont produits dans plusieurs types de lésions du foie. Le  $\text{TNF}\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire dont l'augmentation est notée chez les patients atteints de la NAFLD (*Jarrar et al., 2008*). Cette cytokine pourrait favoriser l'attraction des leucocytes inflammatoires et activer le SREBP1c (protéine régulatrice du stérol), qui à son tour régule la lipogénèse (*Endo et al., 2007*). Ces données confirment que le BPA affecte directement l'homéostasie hépatique

et peut déclencher une lipogenèse en inhibant également la production d'adiponectine par le tissu adipeux (*Ben-Jonathan et al., 2009 ; Hugo et al., 2008*).

La dégénérescence des hépatocytes, des infiltrations inflammatoires ainsi l'apparition des foyers nécrotiques observés dans notre étude peut être due à la production accrue des ROS affectant ainsi l'homéostasie hépatique. Ahmed (2015) a aussi trouvé des modifications de la structure des hépatocytes après le traitement par le BPA. La manifestation d'une dégénérescence nucléaire, dysfonctionnement mitochondrial, dilatation et congestion dans les sinusoides sanguins ont été reporté par les mêmes auteurs. Outre, Korkmaz (2010) a observé des congestions et des foyers nécrotiques au niveau du foie des rats traités par différents polyphénols (BPA, NP et OP). De même, une étude égyptienne menée par l'institut national de nutrition a reporté une congestion et dilatation des veines centrales, prolifération accrue des cellules de Von Kupffer, infiltration lymphocytaire et une légère inflammation après l'administration du BPA (10-30 mg/kg p.c) (*Helal et al., 2013*). Également, Kourouma et ses collègues (2015) ont montré qu'une dose élevée du BPA (50mg/kg i.p) augmente non seulement la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais diminue également sa capacité à détoxifier les ROS. D'ailleurs, l'activité des enzymes hépatiques tels que la transaminase glutamique-oxalacétique (GOT), la transaminase glutamique-pyruvique (GPT) et le lactate déshydrogénase (LDH) ont été significativement augmentés en réponse à la même dose élevée du BPA. Tandis, l'activité enzymatique du  $\gamma$ -Glutamyl Transferase ( $\gamma$ -GT) a été diminuée de façon significative. Ce déséquilibre enzymatique est un marqueur de dommage hépatique : apoptose des hépatocytes.

La supplémentation en sélénium et en vitamine E a restauré le déséquilibre induit par le BPA ce qui est concorde avec l'étude de Ben Amara dont elle a constaté une restauration de l'activité enzymatique des ASAT et ALAT et la diminution du taux de bilirubine totale après une supplémentation en sélénium et en vitamine E chez des rattes traités par le dimethoate ; un pesticide utilisé pour la protection des pommiers (*Ben Amara et al., 2011*). De plus, l'utilisation du sélénium pour la protection contre la cytotoxicité induite par l'arsenic a révélé un rétablissement du taux de glucose, albumine et l'activité enzymatique de l'ASAT, l'ALAT et de la PAL (*Messarah et al., 2012*). L'effet réparateur de la vitamine E et du sélénium sur la structure histologique est bien documenté dans la stabilisation des membranes cellulaires et nucléaires. Ils jouent un rôle de piègeurs des ROS. Messarah et son équipe (2012) ont reporté une récupération de la structure cellulaire normale du foie par le sélénium après le reçoit de l'arsenic. De plus, le sélénium a atténué les changements histopathologiques au niveau des

poumons suivant un traitement par le BPA (*Abdelhaffez et al., 2017*). Al-Attar a reporté le rôle protecteur de la vitamine e contre la toxicité d'un mélange des métaux lourd (Pb, Hg, Cd et Cu) sur la morphologie des reins et des testicules. La vitamine E a diminué les altérations histologiques dans les différents groupes (*Al-Attar., 2011*). Ainsi, une supplémentation en sélénite de sodium (1mg/kg p.c, i.p) a considérablement réduit l'activité de la bilirubine totale et de l'ALAT et a restauré le taux GSH et l'activité enzymatique du SOD bien qu'il a diminué l'activité de la catalase et le taux de MDA. Ces résultats indiquent que le sélénite de sodium atténue successivement la cirrhose du foie induite par le thioacétamide (*Syeda Nuzhat et Tabassum., 2013*). La supplémentation en vitamine E et sélénium a diminué l'activité de l'aspartate amino transferase (AST), alkaline phosphatase et la concentration du glucose chez des rats souffrés d'une résistance à l'insuline avec un aspect normal des hépatocytes (*Ghassemi et al., 2014*). De même, Sadeghian (2014) a trouvé que le sélénium a amélioré le profile lipidique des rats ayant un syndrome métabolique (NAFLD) ce qui diminue l'infiltration des cellules inflammatoires dans le parenchyme hépatique.

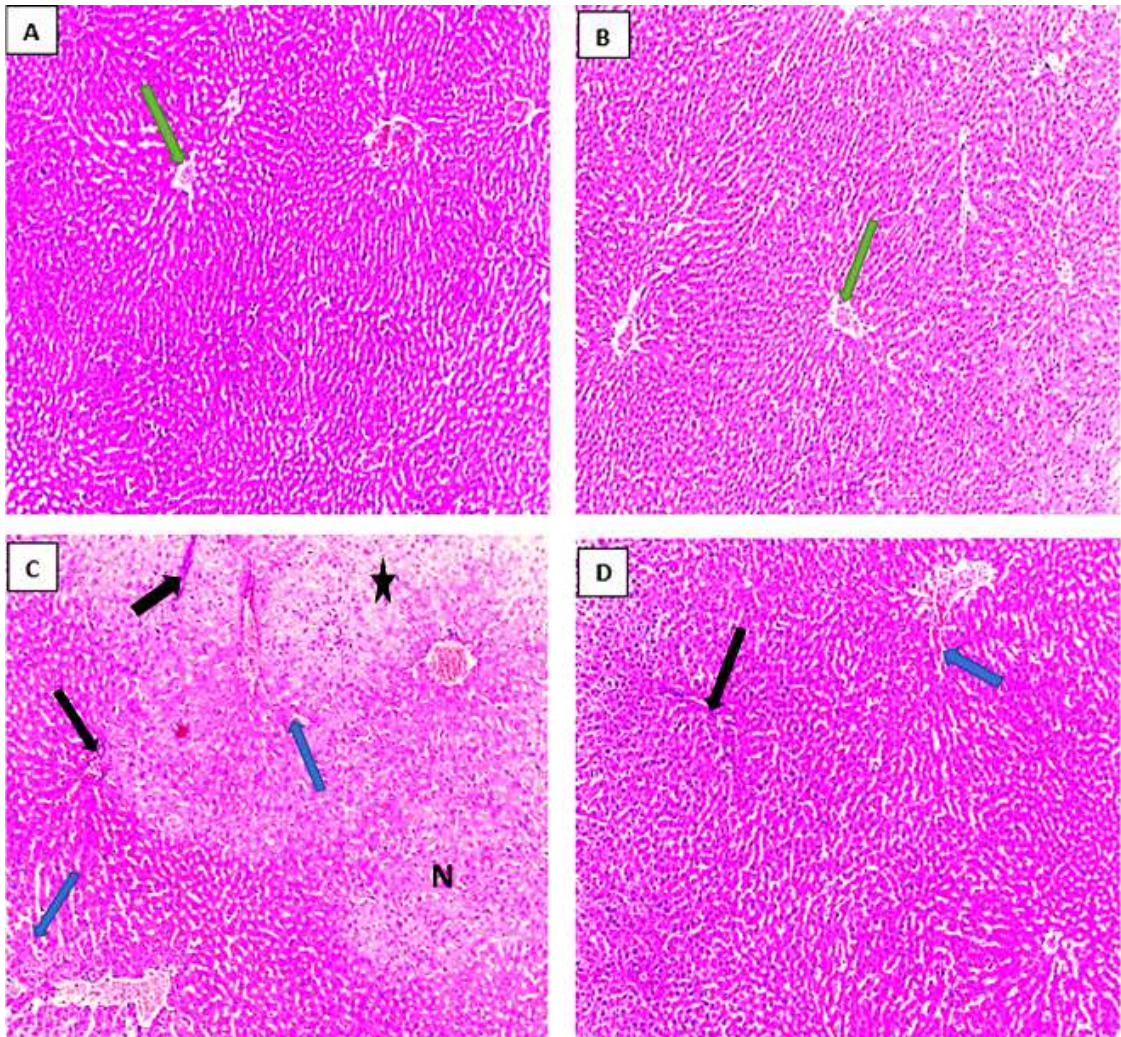


Figure 24. Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline et l'éosine au niveau du foie des rats de différents groupes ( $\times 10$ ). (A) témoin. (B) (se+vit E). (C) BPA. (D) (BPA/Se+Vit E). (*Flèche vert*) veine porte centrale. (*Flèche bleue*) congestion du vaisseau sanguin hépato portale. (*Etoile*) dégénérescence des hépatocytes. (*Flèche noire*) infiltrations inflammatoires. (N) foyers nécrotiques

#### 4.4. Néphrotoxicité induite par le Bisphénol A : Effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et en vitamine E

##### 4.4.1. Action sur quelques paramètres sériques de la fonction rénale :

❖ Analyse des résultats :

Nos résultats obtenus montrent une augmentation significative de la concentration de l'urée et de la créatinine suivant un traitement par le BPA par rapport au groupe témoin et (Se+Vit E) (Tab.19). Tandis, le reçoit du sélénium et de la vitamine E a diminué leurs teneurs à l'état normale comparable à celle du groupe témoin et (Se+Vit E).

**Tableau 19. Variation de la concentration de l'urée (g/l) et de la créatinine (mg/dl) chez les rats de différents groupes.**

Paramètres	Témoin	(Se + Vit E)	BPA	BPA/(Se+Vit E)
Urée (g/l)	0.62±0.15 <sup>b</sup>	0.59± 0.13 <sup>b</sup>	1.65± 0.11 <sup>a</sup>	0.66± 0.16 <sup>b</sup>
Créatinine (mg/dl)	0.25±0.04 <sup>b</sup>	0.28± 0.05 <sup>b</sup>	0.41±0.04 <sup>a</sup>	0.30±0.03 <sup>b</sup>

\* Les moyennes ne partagent aucune lettre sont significativement différentes (p<0.05)

##### 4.4.2. Action sur le taux du MDA et GSH et sur l'activité de quelques enzymes antioxydantes :

Le statut antioxydant/oxydant a été perturbé en réponse à l'administration de 10mg/kg p.c du BPA. En effet, le taux tissulaire de MDA était élevé par rapport aux rats témoins et aux rats reçus (Se+Vit E). À l'opposé, le taux du GSH était plus réduit chez les mêmes rats en comparaison aux rats des autres trois groupes. Également, l'activité enzymatique de la GPx et de la CAT a été diminuée de façon significative par rapport aux rats témoins et aux rats reçus (Se + Vit E). Cette diminution persiste même après l'ajout du (Se+Vit E) au régime des rats administré le BPA. D'ailleurs, la diminution significative de l'activité de GST suite au gavage du BPA a été rétablie après la supplémentation en (Se + Vit E) (Tab.20).

**Tableau 20. Variation du taux du MDA (nmol/mg prot), GSH (nmol/mg prot) et de l'activité de quelques enzymes antioxydantes au niveau des reins des rats de différents groupes.**

Paramètres	Témoïn	(Se + Vit E)	BPA	BPA/(Se+Vit E)
MDA (nmol/mg prot)	0,61±0,03 <sup>b</sup>	0,66±0,04 <sup>b</sup>	1,02±0,01 <sup>a</sup>	0,78±0,03 <sup>a, b</sup>
GSH (nmol/mg prot)	104,4±9.8 <sup>a</sup>	102,9±5.4 <sup>a</sup>	58,38±11.3 <sup>b</sup>	91,13±8.52 <sup>a</sup>
Glutathionne peroxydase <sup>1</sup>	120.30±13.50 <sup>a</sup>	143.12±6.26 <sup>a</sup>	85.18±11.21 <sup>b</sup>	99.65±11.25 <sup>b</sup>
Glutathionne transférase <sup>2</sup>	5.29±2.73 <sup>a</sup>	6.56±4.21 <sup>a</sup>	3.02±2.31 <sup>b</sup>	5.64±2.78 <sup>a</sup>
Catalase <sup>3</sup>	59.26±3.59 <sup>a</sup>	64.15±3.15 <sup>a</sup>	44.02±3.98 <sup>b</sup>	54.09±3.25 <sup>a, b</sup>

<sup>1</sup> Glutathionne peroxydase : nmol GSH/min/mg protein, <sup>2</sup> Glutathionne transférase: nmol C-DNB/min/mg<sub>prot.</sub>

<sup>3</sup>Catalase: µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /min/mg<sub>prot.</sub>

\* Les moyennes ne partagent aucune lettre sont significativement différentes (p<0.05)

#### 4.4.3. Action sur la structure histologique des reins :

Le traitement par 10 mg/kg p.c du BPA a entraîné des altérations histologiques au niveau des reins. Des infiltrations inflammatoires (flèche noire) ont été enregistrées avec des tubules distaux contournés (flèche blanche) et proximaux (flèche rouge) (Fig.25). De plus, une dilatation et congestion des vaisseaux sanguins (flèche bleue) ont été trouvée chez les mêmes rats. Après l'ajout de sélénium et de la vitamine au régime des rats traités par le BPA, une réparation cellulaire a été entamée et la diminution de nombre des tubules proximaux contournés et l'inflammation.

**Tableau 21. Comptage semi quantitatif des modifications histo-structurales au niveau du rein des rats de différents groupes.**

Paramètres	Groupes			
	Témoïn	(Se +Vit E)	BPA	BPA/(Se+ Vit E)
Tubules distaux contournés	-	-	+++	+
Tubules proximaux contournés	-	-	+++	+
Dilatation et congestion de vaisseaux sanguins	-	-	++	+
infiltration inflammatoire	-	-	+++	+

(-) Normale, (+) légère, (++) modérée, (+++) sévère

### ❖ Discussion :

La principale fonction des reins est de détoxifier et d'excréter les déchets dehors l'organisme. Malgré cela, nos résultats ont montré un taux élevé des deux métabolites majeurs : l'urée et la créatinine sérique qui sont des déchets produits par le métabolisme protéique. Lorsqu'une insuffisance rénale s'établit, le taux de ces indicateurs augmente, c'est ce que nous avons observé chez les rats traités avec le BPA. De plus, un stress oxydatif a été induit par le BPA objectivé par une surproduction de MDA et un déclin de l'activité enzymatique de GPx, GST et de la CAT. Helal (2013) a constaté les mêmes résultats avec un pourcentage de changement (40% urée et 22% créatinine) par rapport au témoin. Par contre, Korkmaz (2011) n'a pas trouvé aucune signification du taux de la créatinine entre les rats administrés le BPA et ceux témoins. D'autre part, il a enregistré une diminution significative du taux de la créatinine après la supplémentation en vitamine C par rapport aux rats traité seulement par le BPA et aux rats témoins. De plus, une congestion des vaisseaux sanguins et des endroits nécrotiques ont été constaté par le même hauteur. Yildiz et Barlas (2013) n'ont enregistré aucun changement du taux de l'urée ou de la créatinine chez les rats traités par le BPA (125-250mg/kg/j). Cependant, une dégénérescence des tubules rénales et une fibrose ont été enregistrées chez les mêmes rats. Nos observations au niveau histologique des rats traité par le BPA sont en accorde aussi avec les résultats obtenus par Helal (2013) qui a reporté une infiltration des cellules mononucléaires et une dégénérescence tubulaire au niveau des reins ainsi qu'une hémorragie. Également, Olea-Herrero et ses collègues (2014) ont observé que le BPA pouvait induire une hypertrophie et une apoptose dans des podocytes de souris en culture. Ces effets ont été accompagnés par une augmentation de l'inhibiteur de la kinase dépendant de la cycline p27kip1, le TGF- $\beta$  et collagène IV (classiquement impliquées dans la glomérulosclérose).

Peu de documentations épidémiologiques misent en évidence une corrélation entre la présence du BPA et les maladies chroniques des reins. Chez les patients souffrants d'une insuffisance rénale, l'excrétion urinaire de BPA semble diminuer, ce qui permet son accumulation. Le taux sanguin du BPA est en corrélation avec le taux de la créatinine sérique (très élevé), comme l'a montré deux études japonaises (*Haishima et al., 2001 ; You et al., 2011*). D'ailleurs, deux autres études de population, l'une impliquait 3077 de la population adulte chinoise (*Li et al., 2012*) et l'autre impliquait 710 enfants aux États-Unis (*Trasande et al., 2013*). Les deux études ont démontré une association significative entre l'excrétion urinaire de la concentration de BPA et l'albuminurie.

Il est bien documenté que la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine E améliore les déséquilibres métaboliques et histologiques induits par différentes toxines (Yilmaz et Yilmaz., 2006 ; Bucoli et al., 2011 ; Srikanta et al., 2011). D'ailleurs, une dose de 5 mg/kg/j de la Vitamine E a réduit le taux de MDA et a augmenté le taux du GSH et de la vitamine E rénale (Bucoli et al., 2011). De plus, Yilmaz et Yilmaz (2006) ont reporté une augmentation de l'activité enzymatique de la GPx mais non pas de la CAT après une supplémentation de 100 mg/kg/j p.c (i.p) de vit E aux rats soumis à une irradiation (720 cGy). Un rétablissement du taux de GSH réduit, acide ascorbique a été enregistré suivant une supplémentation de 200mg/kg/j de Vit E. Alors que, l'activité enzymatique du Cu/Zn-SOD, Mn-SOD et catalase chez les rats traités au L-thyroxine (Srikanta et al., 2011). Un traitement oral par 250 mg/kg/j de vitamine C, 250 mg/kg/j de vitamine E et 0.25 mg/kg/j du sélénate sodium a entraîné une diminution significative du taux de LPO et une augmentation du taux de GSH dans les reins de rats recevant du cadmium. Ainsi, Les taux sériques de l'urée et de la créatinine ont été diminués (Karabulut-Bulan et al., 2008). Bien que, un régime déficient en sélénium a provoqué une diminution significative de l'expression de l'ARNm glomérulaire du Cu/Zn-SOD, de la catalase et de la GPx avec une augmentation significative de l'ARNm de TGF-b1 (une cytokine profibrotique). Or, une supplémentation en Se a amélioré considérablement l'expression de l'ARNm glomérulaire des enzymes antioxydantes. Au niveau histologique, le Se non seulement a renversé la sclérose glomérulaire, mais élargit également la taille de la lumière de l'artère interlobulaire (Reddi et Bollineni., 2001).

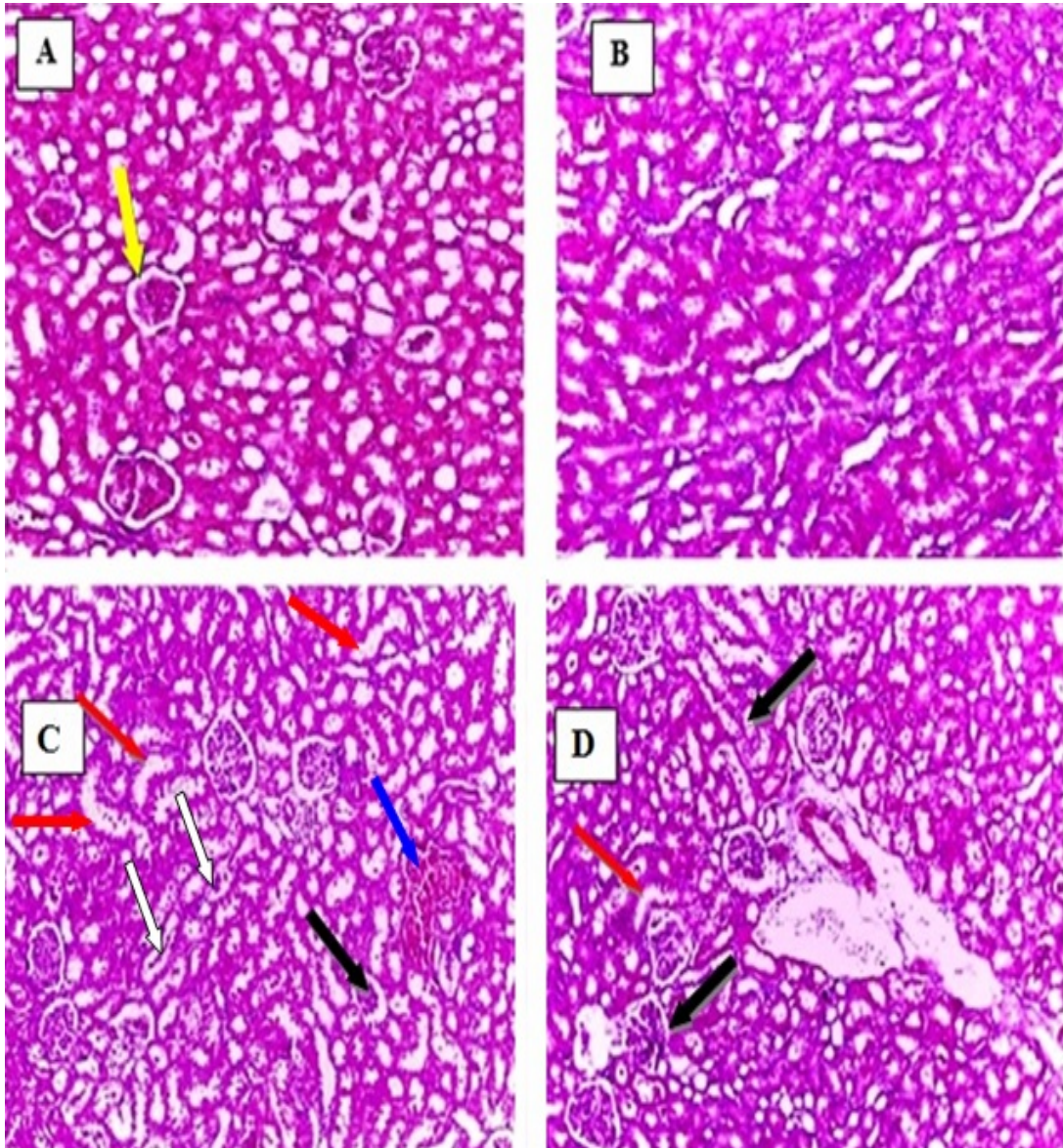


Figure 25. Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline et l'éosine au niveau du rein des rats de différents groupes ( $\times 10$ ). (A) témoin. (B) (se+vit E). (C) BPA. (D) (BPA/Se+Vit E). (*Flèche noire*) infiltrations inflammatoires. (*Flèche blanche*) tubules distaux contournés. (*Flèche rouge*) tubules proximaux contournés. (*Flèche bleue*) une dilatation et congestion des vaisseaux sanguins.

#### 4.5. Reprorotoxicité induite par le bisphénol A : Effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et en vitamine E

##### 4.5.1. Action sur quelques hormones de la reproduction :

Une diminution significative de la concentration de la testostérone a été constatée après le traitement des rats par le BPA. En revanche, une augmentation de la concentration de LH a été enregistrée chez les mêmes rats par rapport aux rats témoins. De plus, une diminution significative du taux sérique de la triiodothyronine (T3), la thyroxine (T4) et de la TSH a été noté chez les rats traités par le bisphénol A ainsi chez la rats recevant en concomitante le BPA et (Se+Vit E) par rapport aux rats témoins.

D'autre part, la supplémentation en sélénium et en vitamine E a modifié le désordre hormonal. Un rétablissement du taux de LH et la testostérone a été observé chez le quatrième groupe par rapport au groupe BPA. En revanche, le taux des HTs ne montre aucune amélioration.

Table 22. Variation du profil hormonal sexuel chez les rats des différents groupes.

Paramètres	Témoin	(Se + Vit E)	BPA	BPA/(Se+Vit E)
LH (UI/l)	0.003±0.001 <sup>b</sup>	0.004± 0.001 <sup>b</sup>	0.007± 0.002 <sup>a</sup>	0.004± 0.001 <sup>b</sup>
Testostérone (ng/dl)	0.028±0.002 <sup>a</sup>	0.029±0.001 <sup>a</sup>	0.011±0.002 <sup>b</sup>	0.022±0.002 <sup>a</sup>
TSH (mUI/L)	0,0041±0,0005 <sup>b</sup>	0,0051±0,0004 <sup>a</sup>	0,0038±0,0005 <sup>b</sup>	0,0030±0,0005 <sup>a,b</sup>
T3 (pg/mL)	0,12±0,010 <sup>a</sup>	0,13±0,004 <sup>a</sup>	0,08±0,009 <sup>b</sup>	0,09±0,004 <sup>b</sup>
T4 (pg/mL)	0,0065±0,0008 <sup>a</sup>	0,0061±0,0006 <sup>a</sup>	0,0022±0,0006 <sup>b</sup>	0,0021±0,0003 <sup>b</sup>

\* Les moyennes ne partagent aucune lettre sont significativement différentes (p<0.05)

##### 4.5.2. Action sur le taux du MDA et GSH et sur l'activité de quelques enzymes antioxydantes :

Les rats ont présenté un taux élevé du MDA statistiquement significatif suivant un traitement par le BPA en comparant aux rats du groupe témoin ainsi du groupe (SE+Vit E). Cependant, le taux du GSH est diminué significativement chez les mêmes rats. D'ailleurs, une réduction significative de l'activité enzymatique de la GPx, GST et la catalase a été enregistrée chez les mêmes rats (Tab.23).

D'autre part, la supplémentation en sélénium et en vitamine E a rétabli la défense antioxydante chez les rats du quatrième groupe BPA/ (Se+vit E). En effet, le Se et la Vit E ont réduit le taux du MDA testiculaire. Pareillement, l'activité enzymatique de la GPX, GST et de la CAT a été renforcée de façon significative suivant l'ajout de Se et Vit E au régime des rats traités par le BPA par rapport aux rats traités seulement par le BPA.

**Tableau 23. Variation de taux du MDA (nmol/mg prot), GSH (nmol/mg prot) et de l'activité de quelques enzymes antioxydantes au niveau des testicules des rats de différents groupes.**

Paramètres	Témoin	(Se +Vit E)	BPA	BPA/(Se+ Vit E)
MDA (nmol/mg prot)	0,55±0,02 <sup>b</sup>	0,49±0,04 <sup>b</sup>	0,77±0,08 <sup>a</sup>	0,61±0,05 <sup>a, b</sup>
GSH (nmol/mg prot)	137,97±8.5 <sup>a</sup>	146,2±11.6 <sup>a</sup>	47,38±13.53 <sup>c</sup>	112,15±9.19 <sup>b</sup>
Glutathionne peroxydase <sup>1</sup>	169.2 ± 24.12 <sup>a</sup>	175.51±11.3 <sup>a</sup>	90.76±13.52 <sup>b</sup>	115.12±14.35 <sup>b</sup>
Glutathionne transférase <sup>2</sup>	0.45±0.12 <sup>a</sup>	0.62±0.14 <sup>a</sup>	0.26±0.15 <sup>b</sup>	0.49±0.19 <sup>a, b</sup>
Catalase <sup>3</sup>	102.11±11.05 <sup>a</sup>	101.59±8.25 <sup>a</sup>	65.74±14.36 <sup>b</sup>	99.48±10.68 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Glutathionne peroxydase : nmol GSH/min/mg protein, <sup>2</sup> Glutathionne transférase: nmol C-DNB/min/mg<sub>prot.</sub>

<sup>3</sup>Catalase : µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /min/mg<sub>prot.</sub>

\* Les moyennes ne partagent aucune lettre sont significativement différentes (p<0.05)

#### 4.5.3. Action sur la structure histologique des testicules :

Les testicules des rats témoins et du groupe (Se+Vit E) portent une histoarchitecture normale. Le tubule séminifère renfermé par une gaine péri tubulaire et entouré par des cellules interstitielles de Leydig (flèche bleue). Il porte des cellules germinales en différents stade d'évolution (spermatogénèse active) et des cellules de soutien ; Sertoli ; de forme pyramidale. La lumière tubulaire est riche en spermatozoïdes (flèche blanche). Par contre, l'administration du BPA a entraîné des malformations histologiques bien distinctes au niveau des tubes séminifères. Parmi, une diminution des cellules germinales (G), atrophie des tubes séminifères (flèche noire), vacuolisation (V), cellules interstitielles moins développées et dégénérées (flèche rouge) (Fig.26). En outre, la vitamine E et le sélénium ont guéri et modifié ces altérations et la spermatogénèse est revenue dans la plupart des tubes séminifères.

Tableau 24. Comptage semi quantitatif des modifications histo-structurales au niveau du testicule des rats de différents groupes.

Paramètres	Groupes			
	Témoin	(Se +Vit E)	BPA	BPA/(Se+ Vit E)
Diminution des cellules germinales	-	-	+++	+
Atrophie des tubes séminifères	-	-	+++	+
Vacuolisation	-	-	+++	+
Cellules interstitielles dégénérées	-	-	+++	+

(-) Normale, (+) légère, (++) modérée, (+++) sévère

#### ❖ Discussion :

L'accusé du BPA d'être une molécule reprotoxique a été fondée sur le nombre croissant des recherches menées par des endocrinologues et les rapports annoncés par les différentes agences sanitaires. L'homéostasie testiculaire non seulement des animaux de laboratoire mais aussi celle de l'homme a été perturbée suivant l'administration du BPA (*Inserm., 2010 ; Anjum et al., 2011 ; El-Beshbishy et al., 2013 ; Hanaoka et al., 2013. Eladak et al., 2015*).

La chute de l'activité enzymatique testiculaire de l'acide phosphatase, l'alkaline phosphatase et le lactate déshydrogénase était l'observation importante déclarée par El-Beshbishy (2013). Ainsi, le succinate déshydrogénase, le malate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase, la monoamine oxydase et la NADH déshydrogénase ont été diminués chez les rats après le gavage de 10 mg/kg p.c. du BPA (*El-Beshbishy et al, 2013*). Également, une étude antérieure a reporté les mêmes résultats utilisant la même dose de 10 mg/kg p.c. du BPA (*Anjum et al., 2011*). Outre, la concentration de la testostérone basale est diminuée tandis le taux de LH est augmenté ; indiqué le même auteur. De même, on a constaté une diminution de la testostérone avec un taux élevé de LH chez les rats traités par le BPA par rapport aux rats témoins. Aussi, une étude française en collaboration entre l'université de Paris Diderot, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale et l'hôpital A. Béclère a révélé la même perturbation des hormones sexuelles au niveau des testicules implantés (rat, souris et fœtus humain) avec un système de culture (fetal testis assay [FeTA]). Une diminution de la sécrétion de la testostérone est remarquée suivant un traitement avec des

doses croissantes (10 nmol/L, 100 nmol/L, 1000 nmol/L) du BPA, BPF et BPS (BPF et BPS sont des alternatives du BPA) chez les trois modèles utilisés (*Eladak et al., 2015*). En revanche, une diminution de la concentration de la testostérone et LH suivant un traitement par le BPA (20, 100 et 200 mg/kg p.c/jr) ou l'E2 (10 et 100 µg/kg p.c/jr) pendant six semaines, mais aucun effet sur la concentration de l'E2 et FSH (*Nakamura et al., 2010*). Cette perturbation hormonale a été associée à une diminution significative du poids absolu ou relatif des organes reproducteurs (testicules, épидидyme, vésicule séminale et la prostate). De plus, le nombre des cellules de Leydig a été diminué sans affecter le nombre des cellules de Sertoli.

Il est connu que la testostérone est synthétisée à partir du cholestérol dans les cellules de Leydig. Le cholestérol produit dans les cellules est transporté dans les mitochondries via des protéines StAR et PBR (*Hauet et al., 2005 ; Papadopoulos., 1993 ; Stocco et Clark., 1996*), et convertis en pregnénolone par l'action catalytique de P450<sub>scc</sub> (cholesterol side-chain cleavage enzyme) (*Hanukoglu., 1992 ; Jefcoate et al., 1992*). Ensuite, la prégnénolone est convertit en androstendione dans le réticulum endoplasmique lisse (RE) par deux voies : une voie, via le DEHA, via P450<sub>17α</sub> puis le DEHA (déhydroépiandrostérone) est modifié en androstendione par l'action catalytique du 3-HSD. L'autre voie passe par la progestérone catalysée par la 3-HSD, suivie par la catalyse en androstendione par P450<sub>17α</sub>. Dans le RE, l'androstendione est converti en testostérone par 17-HSD (*Payne et Youngblood., 1995*). Nakamura a rapporté que le BPA et l'E2 ont réduit de manière indépendante l'expression de StAR et d'enzymes stéroïdiennes telles que P450<sub>scc</sub>, P450<sub>17α</sub> et 17-HSD-ARNm. Cependant, ces traitements n'ont pas influencé le 3-HSD-ARNm, une autre enzyme stéroïdienne. Par conséquent, la diminution de l'expression des enzymes stéroïdiennes et de StAR impliquant dans la synthèse de la testostérone pourrait être principalement associée à la diminution du taux de la testostérone suivant le traitement au BPA et à l'E2 (*Nakamura et al., 2010*).

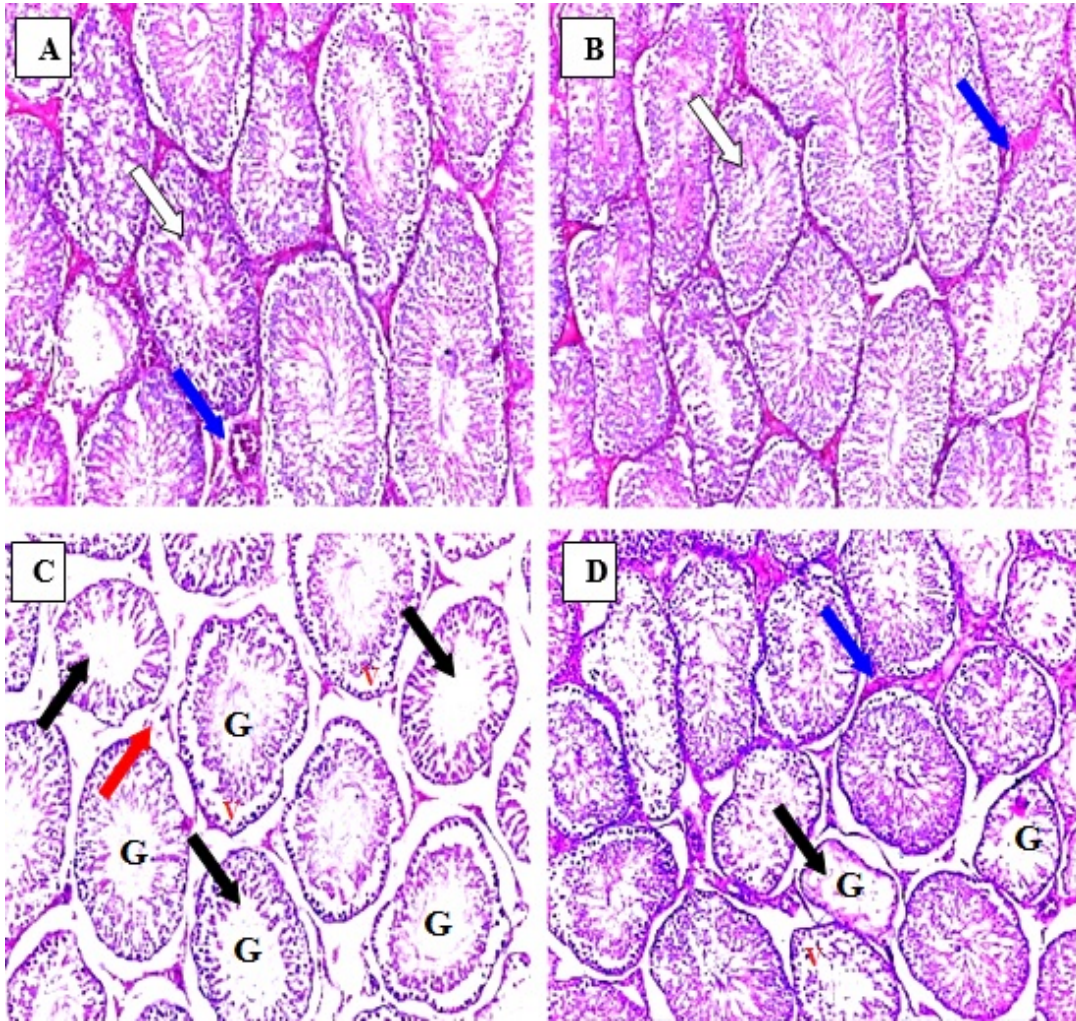
Une étude épidémiologique a mis une corrélation positive entre le taux urinaire du BPA et le métabolisme des œstrogènes chez les adultes coréens (*Kim et al., 2013*). Les concentrations d'estrone, de 17β-œstradiol et de leurs métabolites hydroxylés chez les hommes et les femmes étaient significativement plus élevées dans le groupe BPA-H (11.05 ± 20.47 µg/g créatinine) que dans le groupe BPA-L (0.70 ± 0.22 µg/g créatinine) (p < 0.04). En effet, le taux de 4-hydroxyœstrogènes a augmenté chez les hommes et les femmes, tandis que le taux de 2-OH-E1 a augmenté chez les hommes mais le taux de 2-OH-E2 a augmenté chez les femmes. De plus, la 4-hydroxylation était plus active que la 2-hydroxylation dans le groupe BPA-H, où les 4-hydroxyœstrogènes sont connus pour être une source de stress oxydant par le biais du

cycle redox métabolique de l'œstrogène conduisant à la formation de carcinogènes endogènes (Parl et al., 2009). Au contraire, la 2-hydroxylation est bénéfique car 2-méthoxyestrogènes pourraient être excrétés et le 2-MeO-E2 agit comme un puissant métabolite anti tumoral dans plusieurs cancers (Fotsis et al., 1994 ; Zhu et Conney., 1998). En conséquence, l'hydroxylation des œstrogènes peut modifier leurs liaisons au récepteur (Kuiper et al., 1997).

En plus de ce qui précède, des travaux antérieures ont mis en évidence la présence du récepteur TR $\alpha$ 1 impliqué dans l'action de la T3 au niveau des testicules ce qui indique l'importance de ces HTs dans le développement testiculaire (Holsberger et al., 2005). La T3 intervient via TR $\alpha$ 1 et TR $\beta$  ainsi la FSH dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli (Holsberger et al., 2005 ; McLachlan et al., 2002 ; Walker et Cheng., 2005). Nos résultats ont montré une insuffisance thyroïdienne caractérisée par un taux élevé de la TSH et un déclin du taux de T3 et T4. En réponse à cette hypothyroïdie, l'hypophyse réagit au manque d'hormones thyroïdiennes (T3 et T4) en sécrétant davantage de TSH pour qu'elle stimule leurs sécrétions. Ce qui explique l'augmentation de son taux sérique. De ce fait, la diminution du taux des HTs peut affecter la fonction des cellules de Sertoli en perturbant ainsi la spermatogenèse. Sachant que ces cellules sont la source première d'œstrogènes de la naissance à la puberté des rongeurs (Van der Molen et al., 1981). Après la puberté, l'expression de l'aromatase diminue et disparaît. Ce sont les cellules de Leydig qui prennent alors le relai (Carreau et al., 1999). Mais les cellules de Sertoli contrôlent de même la fonction des cellules de Leydig par le bai de 5 $\alpha$ -réductase et androgen-binding protein (ABP) et les facteurs de croissance (Walker et Cheng., 2005).

Ces observations au-dessus peuvent expliquer les altérations histologiques observées dans notre étude. La déficience de la sécrétion de la testostérone peut être due à la destruction des cellules de Leydig. Les cellules de Leydig secrètent cette hormone sexuelle à la présence du glucose et sous l'influence de LH. Antérieurement, Il est bien documenté que le BPA provoque une hyperglycémie plasmique et une résistance à l'insuline. Autant, il diminue les enzymes glycolytiques, le transporteur du glucose-8 (GLUT-8) et le substrat du récepteur à l'insuline-2 (IRS-2) testiculaires chez les rats. L'inhibition des transporteurs du glucose (GLUT-8 et GLUT-2) par le BPA réduire la diffusion du glucose à l'intérieur des cellules de Leydig se qui perturbe le processus de la spermatogenèse et diminue la stéroïdogénèse (Nakamura et al., 2010 ; D'Cruz et al., 2012). La richesse des testicules en acides polyinsaturés en a fait une cible aux ROS. Par conséquence, l'atrophie des tubes séminifères que nous avons constatés est probablement due soit à la diminution du nombre des cellules

interstitielles de Leydig induite à cause de l'inhibition des transporteurs (GLUT-8 et GLUT-2) par le BPA (*D'Cruz et al., 2012*). Soit, par la suppression de la prolifération des cellules de Sertoli par l'inhibition de l'interaction AR N/C et l'encouragement de l'interaction AR-SMRT et AR-NCoR (action antagoniste du BPA au récepteur androgène AR) (*Wang et al., 2017*). Les cellules de Sertoli sont des cellules de soutien primaires créant un environnement physiologique nécessaire au développement des cellules germinales pendant la spermatogenèse (*Kopera et al., 2010*). La régulation de la spermatogenèse par les cellules de Sertoli dépend de ses fonctions et de son nombre. Ge et ses collègues ont étudié l'effet de deux doses du BPA ( $10^{-8}$  M ;  $10^{-5}$  M) sur la prolifération des cellules TM4 de Sertoli en culture. Ils ont conclu que la concentration la plus faible du BPA a activé et régulé positivement les protéines déclenchantes la prolifération des cellules TM4 telles que la protéine ribosomale, le cytochrome b-c1 et le RGGP4, qui sont liées à la prolifération cellulaire, au cycle cellulaire et à l'apoptose (en favorisant le métabolisme énergétique et la production d'ATP). Inversement, la concentration plus élevée de BPA les régule négativement en inhibant la prolifération cellulaire des TM4 (génération des ROS) (*Ge et al., 2014*).



**Figure 26.** Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline et l'éosine au niveau du rein des rats de différents groupes ( $\times 10$ ). (A) témoin. (B) (se+vit E). (C) BPA. (D) (BPA/Se+Vit E). (Flèche bleue) cellules interstitielles de Leydig. (Flèche blanche) tubule séminifère développé. (Flèche noire) atrophie des tubes séminifères. (Flèche rouge) cellules interstitielles moins développées et dégénérées. (G) diminution des cellules germinales. (v) vacuolisation.



# *Conclusion*

## **Conclusion générale :**

Au terme de notre étude, nous pouvons désormais présenter des réponses à notre problématique initiale. Malgré, son implication dans divers domaines de notre vie quotidienne, le bisphénol A est accusé d'être un perturbateur endocrinien en produisant un excès des ROS. D'autre part, notre organisme possède plusieurs systèmes de défense pour contrôler cet excès. Mais, ils peuvent perdre le contrôle et auront un besoin de renforcement par des apports alimentaires en antioxydants.

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

- Un gain du poids corporel durant l'expérimentation.
- Augmentation du poids absolu des reins.
- Un désordre métabolique des biomarqueurs de la fonction hépatique :
  - Augmentation de la concentration sérique du glucose, bilirubine, cholestérol et triglycérides
  - Diminution de la concentration de l'albumine et HDL-ch
  - Augmentation de l'activité enzymatique des transaminases (ASAT et ALAT)
- Un désordre métabolique des biomarqueurs de la fonction rénale :
  - Augmentation de la concentration sérique de l'urée et la créatinine.
- Un déséquilibre de l'homéostasie testiculaire :
  - Diminution de la concentration plasmatique de la testostérone.
  - Augmentation de la concentration plasmatique de LH.
- Un déséquilibre du redox cellulaire induisant ainsi un stress oxydatif objectivé par :
  - Une surproduction du MDA bio marqueur d'une peroxydation lipidique active au niveau du foie, rein, testicule et cerveau.
  - Une chute du taux de la GSH ce qui reflète une surproduction des ROS.
  - Une perturbation des activités de l'activité de quelques enzymes antioxydantes telles que la GPx, le GST et la CAT.

- Une altération histopathologique au niveau foie, rein, et testicule.

La supplémentation en sélénium et en vitamine E chez des rats traités par le bisphénol A a entraîné :

- Une amélioration de la croissance générale des rats
- Un rétablissement des paramètres biochimiques : glucose, bilirubine, triglycérides, cholestérol total, créatinine et urée
- Une réduction de l'activité des biomarqueurs de la cytolyse et de l'inflammatoire : ASAT et ALAT.
- Un déclin du taux de MDA et une augmentation du taux de GSH.
- Le maintien du statut antioxydant par un renforcement de l'activité enzymatique de la GPx, le GST et la CAT.
- Des protections d'ordre histologique, aux niveaux étudiés.

**Les perspectives** de notre travail sont encore nombreuses sur ce sujet, Il serait alors intéressant :

- D'approfondir les recherches par l'étude de la génotoxicité induite par le bisphénol A.
- D'évaluer la teneur en BPA et ses métabolites *in vivo* et *in vitro*.
- D'étudier les effets protecteurs des extraits de plantes médicinales contre la toxicité induite par le bisphénol A *in vivo* et *in vitro*.



# *Références*

**Références:**



**Abad MC., Asari H., O’neill J., Klinger AL., Milligan C. (2008).** Structural determination of estrogen-related receptor gamma in the presence of phenol derivative compounds. *J steroid biochem mol biol*, 108 : 44-54

**Abdelhaffez AS., Abd el-aziz EA., Abdel aziz MA., Ahmed AM. (2017).** Lung injury induced by bisphenol a: a food contaminant is ameliorated by selenium supplementation. *Pathophysiology* : 24(2):81-89.

**Abraham NG and Kappas A. (2008).** Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharm. Rev* 60, 79–127.

**Ahmed WMS, Moselhy WA, Nabil TM. (2015).** Bisphenol a toxicity in adult male rats: hematological, biochemical and histopathological approach. *J global veterinaria* 14 (2): p 228-238.

**Al-attar AM. (2011).** Antioxidant effect of vitamin e treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice. *Saudi j biol sci*; 18(1): p 63-72.

**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):p 1243-1250.

**Anjum S., Rahman S., Kaur M., Ahmad F., Rashid H., Ansari RA., Raisuddin E. (2011).** Melatonin ameliorates bisphenol a-induced biochemical toxicity in testicular mitochondria of mouse. *Food chem toxicol*; 49 (11):2849-2854.

**Artur Y, Cals MJ., Clerc M., Covi G., Crastes DE., Paulet A., Cruz-pastor M., Herbeth B., Laschi-loquerie A., Leclercq M., Maziere JC., Mounie J, Nicol M, Troupel S., Vernet MH. (1994).** Actualisation des données relatives aux tocophérols en biochimie clinique. *Ann. Biol. Clin* ; 52, p 9-31.

**Awadeh FT., Abdelrahman MM., Kincaid RL., Finley JW. (1998).** Effect of selenium supplements on the distribution of selenium among serum proteins in cattle. *dairy sci.* 81:1089-1094.

## B

- Barouki R. (2006).** stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences* ; 22 p 266-272.
- Batista TM., Alonso-magdalena P., Vieira E., Esmeria MC., Cederroth CR., Nef S., Quesada I, Everardo MC., Nadal A. (2012).** Short-term treatment with bisphenol-a leads to metabolic abnormalities in adult male mice. *Plos one*; 7(3): e33814.
- Benachour N and Garis A. (2009).** Toxic effects of low doses of bisphenol a on human placental cells. *Toxicol appl pharm*; 241:322–8.
- Ben amara I., Soudani N., Troudi A., Bouaziz H., Boudawara T ., Zeghal N. (2011).** Antioxidant effect of vitamin e and selenium on hepatotoxicity induced by dimethoate in female adult rats. *Ecotoxicology and environ safety*; 74, p 811–819.
- Ben-jonathan N, Hugo ER., Brandebourg TD. (2009).** Effects of bisphenol a on adipokine release from human adipose tissue: implications for the metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol*; 304, p 49–54
- Bindhumol V, Chitra KC., Mathur PP. (2003).** Bisphenol a induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicol*; 188, p 117–124.
- Bonfeld-jørgensen EC., Long M., Hofmeister MV., Vinggaard AM. (2007).** Endocrine-disrupting potential of bisphenol a, bisphenol a dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ health perspect*; 115.
- Bonnard N., Brondeau MT., Pillière F., Protois JC., Schneider O., Serre P. (2002).** Sélénium et composés., cahier de notes documentaires – hygiène et sécurité du travail. N°186, services techniques et médicaux de l’institut national de recherche et de sécurité, fiche technique n°150.
- Bonnefont-rousselot D., Bastard JP., Jaudon MC., Delallo J. (2003).** Consequences of the diabetic status on the oxidant/ anti-oxidant balance. *Diabetes and metab* ; (26), p163-176.
- Bonvehí JC, Coll FV., rius IA. (2000).** Liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils, formulated preparations, and biscuits. *J.assoc. Off. Anal. Chem. Int*; 83, p 627-634

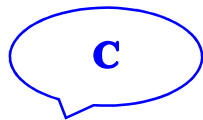
**Bouskine A., Nebout M., Brücker-davis F., Benahmed M., Fenichel P. (2009).** Low doses of bisphenol a promote human seminoma cell proliferation by activating pka and pkg via a membrane g-protein-coupled estrogen receptor. *Environ health perspect*; 117(7); p 1053–1058.

**Bucioli S., Abreu LCD., Valenti VE., Leone C., Vannucchi H. (2011).** Effects of vitamin e supplementation on renal non-enzymatic antioxidants in young rats submitted to exhaustive exercise stress. *Bmc compl altern med*; 11: 133.

**Bührer-astfalk E. (2011).** De la vitamine e ... et de l'utilité de la supplémentation. *Buehrer human nutrition, kleinandelfingen. Maillaiter . Www.swissmilk.ch.*

**Burk RF., Hill KE., Read R., Bellew T. (1991).** Response of rat selenoprotein p to selenium administration and fate of its selenium.. *am j physiol*; 261(1 pt 1); p 26-30.

**Bursztyka J., Perdu E., Pettersson K., Pongratz I., Fernández-cabrera M., Olea N., Debrauwer I., Zalko D., Cravedi JP. (2008).** Biotransformation of genistein and bisphenol a in cell lines used for screening endocrine disruptors. *Toxicol in vitro* ; 22(6), p 1595-1604.



**Calafat AM., Weuve J, Ye X, Jia LT, Hu H. (2009).** Exposure to bisphenol a and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ health perspect*, 117: p 639-644.

**Caliendo H. (2012).** BPA in packaging: a lucrative past, a controversial present and a tentative futur. [Http://plasticstoday.com](http://plasticstoday.com).

**Cano N., Barnoud D., Schneider SM., Vasson MP., Hasselmann M., Leverve X. (2007).** *Traité de nutrition artificielle de l'adulte* .publié .springer-verlag, paris, france

**Carreau S., Genissel C., Bilinska B., Levallet J. (1999).** Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int j androl* ; 22(4): p 211-23.

**Cca (2016).** Programme mixte fao/oms sur les normes alimentaires comité du codex sur la nutrition et les aliments diététiques ou de régime trente-huitième session hambourg, allemagne 5–9 décembre 2016 projet de vnr-b pour la vitamine e. Cx/nfsdu 16/38/4.

**Ce; commission européenne (2008).** European union risk assessment report - 4,4'-isopropylidenediphenol (bisphenol a). Complete risk assessment in one document. Commission européenne, joint research centre. Final approved version awaiting publications.

**Chen J. (2012).** An original discovery: selenium deficiency and keshan disease (an endemic heart disease). *Asia pac j clin nutr* ; 21(3): p 320-326.

**Chitra KC., Latchoumycandane C, Mathur PP. (2003).** Induction of oxidative stress by bisphenol a in the epididymal sperm of rats. *Toxicol*, (185), p 119-127.

**Chow CK., Rucker R., Suttie JW., McCormick DB., Machlin LJ. (2001).** Handbook of vitamins, 3rd ed. Marcel dekker, new york, bâle, p 165-197.

**Cladière M. (2012).** Sources, transfert et devenir des alkylphénols et du bisphénol a dans le bassin amont de la seine : cas de la région île-de-france.

**Combs GFJR., Bunk MJ., Lavorgna MW. (1981).** Vitamin e and selenium important in chick diet. *Feedstuffs usa*, 53, p 19- 20.

**Comité du codex sur la nutrition et les aliments diététiques ou de régime (2014).** Avant-projet de valeurs nutritionnelles de référence supplémentaires ou révisées aux fins d'étiquetage dans les directives concernant l'étiquetage nutritionnel (autres valeurs que les protéines). 36e session kuta, bali indonésie 24 – 28 novembre 2014.

**Cuvelier C, Dotreppe O., Istasse I. (2003).** Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine e. *Ann. Méd. Vét*, 147, p 315-324.



**D'cruz SC., Jubendradass R., Jayakanthan M., Rani SJ., Mathur PP. (2012).** Bisphenol a impairs insulin signaling and glucose homeostasis and decreases steroidogenesis in rat testis: an in vivo and in silico study. *Chem toxicol*; 50(3-4): p 1124-1133.

**Del corso A., Vilardo PG., Cappiello M., Cecconi I., Dal monte M., Barsacchi D., Mura U. (2002).** Physiological thiols as promoters of glutathione oxidation and modifying agents in protein s-thiolation. *Arch biochem biophys* 397, p 392–398.

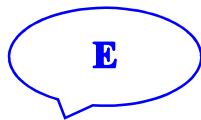
**Dreer M., Fertey J., Van de Poel S., Straub E., Madlung J., Macek B., Iftner T., Stubenrauch F. (2016).** Interaction of ncor/smrt repressor complexes with papillomavirus e8<sup>e</sup>2c proteins inhibits viral replication. Plos pathogens 12, e1005556.

**Derraik JGB. (2002).** The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Marine pollution bulletin, 44(9), p 842-852.

**Devoy J. (2001).** Mécanismes de sorption des espèces du sélénium (sélénite et séléniate) sur des minéraux à base de cuivre. Thèse

**Dodds LW. (1936).** Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. Nature; 137, p 996.

**Duchadeau C. (2001).** vitaminothérapie chez les volailles. Thèse



**ECB; european chemicals bureau (2003).** 4,4'-isopropylidenediphenol (bisphenol a). European union risk assessment report. Vol 37. (ecb.jrc.it/esis)

**EFSA (2006).** Opinion of the scientific panel on food additives, flavouring, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to 2,2-bis(4hydroxyphenyl) propane (bisphenol a) question number efsa-q2005-100. The efsa journal; 428: 1-75.

**EFSA (2008).** Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (afc) on a request from the commission on the toxicokinetics of bisphenol a. The efsa journal, 759, 1-10. [Http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/759.pdf](http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/759.pdf)

**Eid JL., Eissa SMA., El-Ghor A. (2015).** Bisphenol a induces oxidative stress and dna damage in hepatic tissue of female rat offspring a the journal of basic and applied zoology, 71,p 10–19

**Eladak S., Grisin T., Moison D., Guerquin MJ., N'tumba-byn T., Pozzi-gaudin S., Benachi A., Livera G, Rouiller-fabre V, Habert R. (2015).** A new chapter in the bisphenol a story: bisphenol s and bisphenol f are not safe alternatives to this compound. Fertil steril ; 103 (1), p 11-21.

**El-Beshbishy HA., Aly HA., El-Shafey M. (2012).** Lipoic acid mitigates bisphenol a-induced testicular mitochondrial toxicity in rats. Toxicol Ind Health 29: 875.

**El-Demerdash FM. (2004).** Antioxidant effect of vitamin e and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium; j trace elem med biol, 18(1), p 113-121.

**Endo M., Masaki T., Seike M., Yoshimatsu H. (2007).** TNF- $\alpha$  induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (srebp-1c). Experimental biology and medicine 232 (5), p 614-621.

**Endo (2017).** Early-life bpa exposure reprograms gene expression linked to fatty liver disease. The endocrine society's 99th annual meeting and expo. Www.eurokalert.org

**Environnement canada (2008).** Rapport provisoire d'évaluation préalable pour le défi concernant le 4,4'-isopropylidènediphénol (bisphénol-a) numéro de registre du chemical abstracts service 80-05-7 la voie verte.

**Epa: environmental protection agency (2010).** Bisphenol a action plan, and bpa alternatives in thermal paper partnership" sur <http://www.epa.gov>

**Epa: environmental protection agency (2011).** action plan fact sheet. Sur <http://www.epa.gov>

**Evans PJ and Halliwell B (1999).** Free radicals and hearing: cause, consequence, and criteria. Ann n y acad sci 884, p 19-40.



**Fahami NAM., Ismail NM., Khalid KBA. (2005).** Effects of vitamin e on food intake and body weight in rats exposed to restraint stress. Medic journ of islamic world acad of scien 15(2), p 81-86.

**Fang YZ., Yang S., Wu G. (2002).** Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition; 18, p 872-879.

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

**Favier A (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. Ann pharm fr, 64 : 390-396

**FDA (2010).** "Update on bisphenol a for use in food contact applications u.s. Food and drug administration". Consulté le 30/11/2013. Sur <http://www.fda.gov>

**Finch JM and Turner RJ. (1996).** Effects of selenium and vitamin e on the immune responses of domestic animals, res. Vet. Science; 60, p 97-106.

**Flint S., Markle T., Thompson S., Wallace E. (2012).** Bisphenol a exposure, effects, and policy: a wildlife perspective ». Environ manag, 15 (104), p 19-34.

**Fenichel P., Chevalier N., Brucker-davis F. (2013).** Bisphenol a: an endocrine and metabolic disruptor. Ann endocrinol; 74, p 211–220.

**Fotsis T., Zhang Y., Pepper MS., Adlercreutz H., Montesano R., Nawroth PP. (1994).** The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. Nature; 368, p 237–239.



**Garait B. (2006).** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la glisodin

**Gardès-albert M., Bonnefont-rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D (2003).** Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique.

**Ge LC., Chen ZJ., Liu HY., Zhang KS., Liu H., Huang HB., Zhang G., Wong CK., Giesy JP., Du J., Wang HS. (2014).** Involvement of activating erk1/2 through g protein coupled receptor 30 and estrogen receptor  $\alpha/\beta$  in low doses of bisphenol a promoting growth of sertoli tm4 cells. Toxicol lett ; 226(1), p 81-89

**Ghassemi F, Yosefi nasab A, Kargar H (2014).** The protective effect of vitamin e and selenium on liver tissue in fructose- induced diabetic rat. Med sci ;12(2), p 47-55

**Guillar D (2011).** Sélénium et ses composés. I n e r i s - fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques

**Guyot H., Rollin F. (2007).** Le diagnostic des carences en sélénium et iode chez les bovins. Ann. Méd. Vét, 151, p 166-191.

**Gayrard V., Marlène Z., Lacroix N., Séverine H., Collet CV., Alain bousquet-M., Toutain PL, Hagen N. (2013).** High bioavailability of bisphenol a from sublingual exposure. Environ health perspect; 121(8), p 951-956.

**Grimm MO., Mett J., Hartmann T. (2016).** The impact of vitamin e and other fat-soluble vitamins on alzheimer's disease/int. Mol sci; 17(11).

**Gueroui M and Kechrid Z. (2016).** Evaluation of some biochemical parameters and brain oxidative stress in experimental rats exposed chronically to silver nitrate and the protective role of vitamin e and selenium. Toxicol. Res; 32, p 301-309

**H**

**Hanaoka T., Kawamura N., Hara K., Tsugane S. (2002).** Urinary bisphenol a and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol a diglycidyl ether and mixed organic solvents. Occup environ med; 59(9), p 625-628.

**Harisa GI., Abo-Salem OM., El-Sayed SM., Shazly G. (2013).** Effects of nutritional and excessive levels of selenium on red blood cells of rats fed a high cholesterol diet. Biol trace elem res; 152(1), p 41-49.

**Haishima Y., Hayashi Y., Yagami T., Nakamura A. (2001).** Elution of bisphenol-a from hemodialyzers consisting of polycarbonate and polysulfone resins. J biomed mater res, 58, p 209–215.

**Hawkes WC and Keim NL. (2003).** Dietary selenium intake modulates thyroid hormone and energy metabolism in men. J. Nutr. 133, p 3443–3448,

**Hanioka N., Naito T., Narimatsu S. (2008).** Human udp-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol a glucuronidation. Chemosphere, 74, p 33-36.

**Hanukoglu I. (1992).** Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. J. Steroid biochem. Mol. Bio; 43, p 779–804.

**Hauet T., Yao ZX., Bose HS., Wall CT., Han Z., Li W., Hales DB., Miller WL., Culty M., Papadopoulos V. (2005).** Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. Mol. Endocrinol, 19, p 540–554.

**Helal EGE., Badawi MMM., Soliman MG., Abdel-Kawi NA., Fadel HAE, Abozaid, NMG. (2013).** Physiological and histopathological studies on bisphenol a compound as xenoestrogen in male albinos rats. Egyp j: hospt med; 50, p 127-136.

**Helal EGE., Taha NM., Ahmed MM., Abu-Taleb HM. (2016).** Ameliorative effect of vitamin e on oxidative stress induced by bisphenol a in female albino rats. Egyptian journal of hospital medicine; 65, p 474-478.

**Holsberger DR., Kiesewetter SE., Cooke PS. (2005).** Regulation of neonatal sertoli cell development by thyroid hormone receptor alpha1. Biol of repro; 73, p 396-403

**Hormann AM., Vom Saal FS., Nagel SC., Stahlhut RW., Moyer CL., Ellersieck MR., Welshons WV, Toutain PL., Taylor JA. (2014).** Holding thermal receipt paper and eating food after using hand sanitizer results in high serum bioactive and urine total levels of bisphenol a (bpa). Plos one 9(10): e110509.

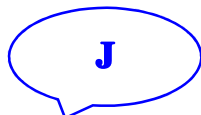
**Huc L., Lemarié A., Guéraud F., Héliers-Toussaint C. (2012).** Low concentrations of bisphenol a induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of hepg2 cells. Toxicol in vitro; 26(5), p 709-717.

**Hugo ER., Brandebourg TD., Woo JG., Loftus J., Alexander JW., Ben-Jonathan N. (2008).** Bisphenol a at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. Environ. Health perspect; 116, p 1642–1647.



**Ineris - institut national de l'environnement industriel et des risques (2010)** données technico-économiques sur les substances chimiques en france : bisphénol a, consulté le 03.04.15 sur [www.ineris.fr/substances](http://www.ineris.fr/substances).

**Ivell R, Anand-Ivell R. (2009).** Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction. Hum reprod update; 15, p 463–476.

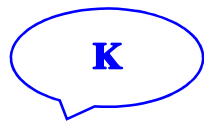


**Jarrar MH., Baranova A., Collantes R., Ranard B., Stepanova M., Bennett C., Fang Y., Elariny H., Goodman Z., Chandhoke V., Younossi ZM. (2008).** Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. Aliment. Pharmacol. Ther ; 27, p 412–421.

**Jefcoate CR., Mcnamara BC., Artemenko ITY. (1992).** Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome p450scc in steroid hormone synthesis. *J. Steroid biochem. Mol. Biol* ; 43, p 751–767

**Joskow R., Barr DB., Barr JR., Calafat AM., Needham LL., Rubin C. (2006).** Exposure to bisphenol a from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. *J am dent assoc*; 137(3), p 353-362.

**Johnson LE. (2017).** Vitamine e. Le manuel msd. Sur [www.msmanuals.com](http://www.msmanuals.com). Consulter 10/10/2017



**Kaddar N., Harthe C., Dechaud H., Pugeat M. (2008).** Cutaneous penetration of bisphenol a in pig skin. *Toxicol environ health*; 71(8), p 471-473.

**Kang JH., Kondo F., Katayama Y. (2006).** Human exposure to bisphenol a. *Toxicol* ; 226,p 79–89.

**Karabulut-Bulan O., Bolkent S., Yanardag R., Bilgin-Sokmen B. (2008).** Role of vitamin c, vitamin e, and selenium on cadmium-induced renal toxicity of rats. *Drug and chemical toxicol*; 31 (4), p 413-426.

**Kim SY., Lee SM., Chang SS., Kawamoto T., Jang JY., Ahn YO. (2003).** Biological monitoring of bisphenol a in a korean population. *Arch environ contam toxicol*; 44(4), p 546-551.

**Kim B. (2008).** Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid*; 18(2), p 141-144.

**Kim JE., Choi SI., Lee HR., Hwang IS., Lee YJ., An BS., Lee SH., Kim HJ., Kang BC., Hwang DY. (2012).** Selenium significantly inhibits adipocyte hypertrophy and abdominal fat accumulation in oltf rats via induction of fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Biol trace elem res* ; 150 (1-3), p 360-370.

**Kim EJ., Lee D., Chung BC., Pyo H. (2013).** Association between urinary levels of bisphenol-a and estrogen metabolism in korean adults. *Sci total environ*; 470-471, p 1401-1407.

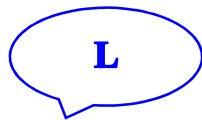
**Kopera IA, Bilinska B, Cheng CY, Mruk DD. (2010).** Sertoli–germ cell junctions in the 585 testis: a review of recent data, *philos. Trans. R. Soc. Lond. B biol. Sci.* 365 (1546), p 1593–1605.

**Korkmaz A, Ahdab MA, Kolankaya D., Barlas N. (2010).** Influence of vitamin c on bipshenol a, nonylphenol, octyphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food chem toxicol* ; 48 (10), p 2865-2871.

**Kourouma A, Quan C, Duan P, Qi P, Yu T, Wang Y., Yang K. (2015).** Bisphenol a induces apoptosis in liver cells through induction of ros. *Advan in toxicol*; 901983.

**Kurebayashi H, Betsui H, Ohno Y. (2003).** Disposition of a low dose of 14-c bisphenol a in male rats and its main biliary excretion as bpa glucuronide. *Toxicol sci* ; 73(1), p 17-25.

**Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J., Nilsson S. (1997).** Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endo*; 138, p 863–870.



**Larbier M and Leclercq B. (1992).** Nutrition et alimentation des volailles. Paris, france : estem, 1992, p 352.

**Larousse médicale (1988).** Anémie. Nouveau larousse médicale, isbn : 2-03-501303-8, p 61-62.

**Lebreton P., Salat O., Nicol JM. (1998).** Un point sur le sélénium, *bulletin des gtv*, 5, p 35-47.

**Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS., Lee K. (2003).** Antiandrogenic effects of bisphenol a and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol sci*; 75(1), p 40-46.

**Lee YJ, Ryu HY, Kim HK, Min CS, Lee JH, Kim E, Nam BH, Park JH, Jung JW, Jang DD, Park EY, Lee KH, Ma JY, Won HS, Im MV, Leem JH, Hong YC., Yoon HS. (2008).** Maternal and fetal exposure to bisphenol a in korea. *Reprod toxicol*; 25(4), p 413-419.

**Lee J. (2010).** Use of antioxidants to prevent cyclosporine a toxicity. *Toxicol res* ; 26 (3), p 163-170.

**Léger CL. (2000).** La vitamine e : état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardiovasculaire, biodisponibilité. Ocl 7, p 258-265.

**Léger CL., Carbonneau MA., Fouret G (2007).** Vitamine E. In cahier de formation en biologie médicale bioforma ; 38, p 49-63.

**Lemly AD. (2004).** Aquatic selenium pollution is a global environment safety. Ecotoxicol and environ safe; 59, p 44-56.

**Li M, Bi Y, Qi L, Wang T, Xu M., Huang Y. (2009).** Exposure to bisphenol a is associated with low-grade albuminuria in chinese adults. Kidney int; 81, p 1131–1139.

**Li DK, Zhou Z, Miao M, He Y, Wang J, Ferber J, Herrinton LJ, Gao E, Yuan W. (2011).** urine bisphenol-a (bpa) level in relation to semen quality.fertil steril; 95(2), p 625-30.

**Lim DS, Kwack SJ, Kim KB, Kim HS., Lee BM. (2009).** Risk assessment of bisphenol a migrated from canned foods in korea. J toxicol environ health a; 72(21-22), p 1327-1335.

**Lindsay DG and astley SB. (2002).** European research on the functional effects of dietary antioxidants: eurofeda. Mol. Aspects med; 23,p 1-38.

**Louisot P. (1983).** Biochimie générale et médicale, structurale, métabolique, séméiologique. Villeurbanne, france : simep. 4 volumes, 1 011 p.



**Macfarquhar JRK, Broussard DL, Melstrom P, Hutchinson R, Wolkin a, Martin C, Curk F, Dunn JR, Green AL, Hammond R, Schaffner W., Jones F. (2010).** Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement arch intern med; 170(3), p 256–261.

**Mclachlan RI, O'donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, De K, Pratis K, Robertson DM. (2002).** Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. Journal of andrology 23(2), p 149-162.

**Marion GV. (2016).** Le bisphénol a : des hépatocytes aux odontoblastes. Thèse, université toulouse III - paul sabatier.

**Masuno H, Iwanami J, Kidani T, Sakayama K., Honda K. (2005).** Bisphenol a accelerates terminal differentiation of 3t3-l1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Toxicol scie 84,p 319–327.

- Matés J, Perez-Gomez C, Nunez Castro I. (1999).** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry journal*, vol 32, pp. 595-603.
- Mcalindon TS and Lo GL (2007).** Selenium and iodine: studies of kashin-beck disease, in osteoarthritis,
- Mcalindon TE and Lo GL. (2015).** Chapter 15 - nutritional and nutritional supplement interventions for osteoarthritis.
- Merzoug S. (2014).** Cheminement du sélénium dans l'est algérien. Thèse
- Messarah M, Klibet F, Boumendjel A, Abdennour C, Bouzerna N, Boulakoud MS, El Feki A. (2012).** Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. *Experiment and toxicol pathol*, 64,p 167–174.
- Messarah M, Amamra W, Boumendjel A, Barkat L, Bouasla I, Abdennour C, Boulakoud MS., El Feki A. (2013).** Ameliorating effects of curcumin and vitamin e on diazinon-induced oxidative damage in rat liver and erythrocytes. *Toxicol ind health*, 29 (1), p 77-88.
- Mikulets YU. (1996).** The action of vitamin e on iron utilization and functional activity of thyroid gland in broiler chicks. *Mezhdunarodnyi sel'skokhozyaistvennyi zhurnal*; 1 , p 55-59.
- Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. (2010).** Urinary bisphenol a concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environ sci technol*; 44(4), p 1458-1463.
- Meeker JD, Ferguson KK. (2011).** Relationship between urinary phthalate and bisphenol a concentrations and serum thyroid measures in u. S. Adults and adolescents from the national health and nutrition examination survey (nhanes) 2007-2008. *Environ health perspect*; 119(10), p 1396-1402.
- Moksnes K. (1986).** A comaraison of selenomethionine and sodium selenite as a supplement in chicken feds. *Acta. Vet. Scand.* 27 (1),p 103-114.
- Murakami K, Ohashi A., Hori H. ((2007).** Accumulation of bisphenol a in hemodialysis patients. *Blood purif*; 25, p 290–294.
- Morel Y And Barouki R. (1999).** Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem* ; 342 (3),p 481-496.
- Mukai K, Morimoto H, Okaiuchi Y., Nagaoka S. (1993).** Kinetic study of reactions between tocopheroxyl radicals and fatty acids. *Lipids* 28, p 753–756.

**Myers JP, Vom Saal FS, Akingbemi BT, Arizono K, Belcher S, Colborn T, Chahoud I, Crain DA, Farabollini F, Guillette LJ, Hassold T, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, Kanno J, Laufer H, Marcus M, Mclachlan JA, Nadal A, Oehlmann J, Olea N, Palanza P, Parmigiani S, Rubin BS, Schoenfelder G, Sonnenschein C, Soto AM, Talsness CE, Taylor JA, Vandenberg LN, Vandenberg JG, Vogel S, Watson CS, Welshons WV, Zoeller RT. (2009).** Why public health agencies cannot depend on good laboratory practices as a criterion for selecting data: the case of bisphenol a. *Environ health persp* ;117(3), p 309-315.

**N**

**Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, Asaeda N, Tagawa Y, Li C, Taya K, Zhang SY, Naito H, Ramdhan DH, Kamijima M., Nakajima T. (2010).** Bisphenol a may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicol lett.* 15; 194(1-2): p 16-25.

**Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H. (2010).** Placental transfer of conjugated bisphenol a and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ health perspect*;118(9), p 1196-1199.

**NTP: national toxicology program (2008).** NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol a. Nih, no. 08-5994 (nih, research triangle park, nc).

**Nunez AAL, Kannan K, Giesy JP, Fang J, Clemens LG. (2001).** Effects of bisphenol a on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere*; 42(8), p 917-922.

**O**

**Olea-Herrero N, Arenas MI, Muñoz-Moreno C, Moreno-Gómez-Toledano R, González-Santander M., Arribas I. (2014).** Bisphenol-a induces podocytopathy with proteinuria in mice. *J cell physiol*; 229, p 2057–2066.

**Ostergaard H, Tachibana C, Winther JR. (2004).** Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J cell biol* 166, 337–345.

**Ognjanovic BI, Markovic SD, Pavlovic SZ., Zikic RV. (2008).** Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effect of selenium. *Physiol. Res*; 57,p 403-411



**Papadopoulos V. (1993).** Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr. Rev.* 14,p 222–240

**Park DH, Jang HY, Park CK, Cheong HT, Kim C., Yang BK. (2004).** Effect of bisphenol a administration on reproductive characteristic and blood metabolite in mice. *Journal of animal science and technology* 46 (6),p 957-966.

**Parl FF, Dawling S, Roodi N, Crooke PS. (2009).** Estrogen metabolism and breast cancer: a risk model. *Ann n y acad sci*;1155, p 68–75.

**Plastics Europe (2012).** « plastics – the facts 2012, an analysis of european plastics demand and waste data for 2011 » sur [www. Plasticseurop.org](http://www.Plasticseurop.org). Consulté le 10/02/2015.

**Petersen SK, Moreau RF, Smith EJ., Hagen TM. (2008).** Is alpha-lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. *Iubmb life* ; 60, p 362–367.

**Peltier C. (2011).** Aliments : une source de produits dangereux ? Sur [www.futura-sciences.com](http://www.futura-sciences.com). Consulté le 02/07/2015.

**Pham HQ and Marks MJ. (2004).** Epoxy resins. *Encyclopedia of chemical technology*, texas: ed. John wiley and sons, 125 p.

**Payne AH and Youngblood GL. (1995).** Regulation of expression of steroidogenic enzymes in leydig cells. *Biol. Reprod.* 52,p 217–225.

**Perez P, Pulgar R, Olea-Serrano F, Villalobos M, Rivas A, Metzler M, Pedraza V, Olea N. (1998).** The estrogenicity of bisphenol a-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ health perspect*; 106(3), p 167-174.

**Perissi V, Jepsen K, Glass CK., Rosenfeld MG. (2010).** Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat rev genet*; 11(2), p 109-123.

**Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. (2000).** Active and inhibited human catalase structures: ligand and nadph binding and catalytic mechanism. *J mol biol.* 296(1), p 295-309.

### R

**Rathee M, Malik P, Singh J. (2012).** Bisphenol a in dental sealants and its estrogen like effect.. *Indian j endocrinol metab;* 16(3), p 339–342.

**Reddi AS and Bollineni JS. (2001).** Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via tgf-b1 in normal and diabetic rats. *Kidney intern;* 59, p 1342–1353

**Rezg R, Saloua AB, El-Fazaa A, Gharbi NA., Mornagui B. (2014).** Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment international;* 64, p 83–90.

**Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC., Soto AM. (2001).** Perinatal exposure to low doses of bisphenol a affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma lh levels. *Environ health perspect;*109, p 675–680.

**Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS., Talsness CE. (2007).** In vivo effects of bisphenol a in laboratory rodent studies. *Reprod toxicol;* 24, p 199–224.

**Rencurel F, Waeber G, Antoine B, Rocchiccioli F, Maulard P, Girard J, Leturque A. (1996).** Requirement of glucose metabolism for regulation of glucose transporter type 2 (glut2) gene expression in liver. *Biochem;* 314,p 903–909.

**Ryter SW, Alam J., Choi AM (2006).** Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol rev* 86,p 583–650.

**Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG., Hoekstra WG. (1973).** Selenium, biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179,p 588-590.



**Shankar A and Teppala SJ. (2011).** Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *Clin Endocrinol Metab*; 96 (12), p 3822-3826.

**Shankar A, Teppala S, Sabanayagam C. (2012).** Urinary bisphenol a levels and measures of obesity: results from the national health and nutrition examination survey 2003-2008. *Isrn endocrinol*; 96, p 42-53.

**Santé canada (2015).** Fichier canadien sur les éléments nutritifs. [Www.hc-sc.gc.ca](http://www.hc-sc.gc.ca) . Consulté le 14 /08/2017

**Sadeghian F, Manochehri M., Jahromi HK. (2014).** Examining the effect of selenium in improving nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Pharmacology*; 8(6), p11.

**Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G., Wuttke W. (2005).** Effects of bisphenol-a (bpa), dibutylphthalate (dbp), benzophenone-2 (bp2), procymidone (proc), and linurone (lin) on fat tissue, a variety of hormones and metabolic parameters: a 3 months comparison with effects of estradiol (e2) in ovariectomized (ovx) rats. *Toxicol* ; 213(1-2), p 13-24.

**Silva C, Azevedo Filho CA, Pereira G, Silva DCN, Castro B, Almeida A, Lucena SCA, Santos BS, Barjas-Castro ML, Fontes A. (2017).** Vitamin e nanoemulsion activity on stored red blood cells. *Transfus med* ; 27(3), p 213-217.

**Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A. (2009).** Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ health perspect*; 117(10), p 1549-1555.

**Silver MK, O'neill MS, Sowers MR, Park SK. (2011).** Urinary bisphenol a and type-2 diabetes in u.s. Adults: data from nhanes 2003-2008. *Plos one*;6(10), e26868.

**Stahlhut RW, Welshons W, Swan SH. (2009).** Bisphenol a data in nhanes suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environ health perspect*, 117, p 784-789.

**Stocco DM and clark BJ. (1996).** Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr. Rev.* 17, p 221–244.

**Savastano S, Tarantino G, D'esposito V, Passaretti F, Cabaro C, Valantino R. (2015).** Bisphenol a plasma levels are related to inflammatory markers, visceral obesity and insulin-resistance: a cross sectional study on adult male population. *J transl med*; 13,p 166-169.

**Sturcbjer-Pierrat C, Carbon P, Krol A. (1995).** Sélénium, sélénoprotéines : une autre lecture du code génétique. *Médecine/sciences* ; 11, p 1081-1088.

**Syeda-Nuzhat F and Tabassum M. (2013).** Role of selenium in protection of liver cirrhosis *pakistan journal of pharmaceutical sciences* 26(6), p 1097-1102.

**Seboussi R. (2008).** Metabolisme du selenium chez le dromadaire. Thèse

**Soriano S, Ripoll C, Alonso-Magdalena P, Fuentes E, Quesada I, Nadal A, Söderhol M. (1999).** "Bis-gma-based resins in dentistry: are they safe?" *the americ dent associat*; 130(2), p 201–209.

**Srikanta J and Gaga C. (2011).** Regulation of expression of antioxidant enzymes by vitamin e and curcumin in l-thyroxine-induced oxidative stress in rat renal cortex. *Molecular biology reports*; 38(2), p1047-1054.



**Takehita A., Koibuchi N, Oka J, Taguchi M, Shishiba Y., Ozawa Y. (2001).** Bisphenol-a, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear receptor, steroid and xenobiotic receptor-mediated transcription. *Eur j endocrinol*; 145, p 513–517.

**Tinggi U. (2003).** Essentiality and toxicity of selenium and its status in australia: a review. *Toxicol. Lett.* 137, p 103–110.

**Tohmé M, Prud'homme SM, Boulahtouf A, Samarut E, Brunet F, Bernard L, Bourguet W, Gibert Y, Balaguer P., Laudet V. (2014).** Estrogen-related receptor g is an in vivo receptor of bisphenol a. *Faseb J*, 28(07), p: 3124-3133.

**Trasande L, Attina TM, Trachtman H. (2013).** Bisphenol a exposure is associated with low-grade urinary albumin excretion in children of the united states. *Kidney int*; 83: p 741–748.

**Trasande I, Attina TM, Blustein J. (2012).** Association between urinary bisphenol a concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *Jama*. Sep 19; 308(11), p 1113-1121.

**Tsukioka T, Terasawa J, Sato S, Hatayama Y, Makino T, Nakazawa H. (2004).** Development of analytical method for determining trace amounts of bpa in urines samples and estimation of exposure to bpa. *Journal of environmental chemistry*, 14, 57-63.

**Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, Veselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, Joiner RL, Butala JH, Dimond SS, Cagen SZ, Shiotsuka RN, Stropp GD, Waechter JM. (2002).** Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol a in cd sprague-dawley rats. *Toxicol sci*; 68 (1):121-146.

**Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Sloan CS, Castillo NP, Veselica MM, Seely JC, Dimond SS, Van Miller JP, Shiotsuka RN, Beyer D, Hentges SG, Waechter JM. (2008).** two generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol a (bpa) in cd-1 (swiss) mice. *Toxicological sciences* 104(2),p 362-384.

### U

**U.S. Environmental protection agency 3/29/2010.** Bisphenol a action plan (casrn 80-05-7) [ca index name: phenol, 4,4'-(1-methylethylidene)bis-]

**U.S FDA: U.s. Food and drug administration (2010)** Update on bisphenol a for use in food contact applications. Sur <http://www.fda.gov>. Consulté le 25/12/2016.

### V

**Van Cauwenberghe I, Vanreusel A, Mees JR, Janssen C. (2013).** Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environ pollut*; 182, p 495-499.

**Vandenberg IN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. (2007a).** Human exposure to bisphenol a (bpa). *Reprod toxicol* ; 24(2):139-177.

**Vandenberg IN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs JR, Lee DH. (2012).** Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr rev* ; 33, p 378–455.

**Van Der M. (1981).** Testicular oestrogens.hj, brinkmann ao, de jong fh, rommerts ff. *J endocrinol*; 89, p 33-46.

**Vanderpump MP, Ahlquist JA, Franklyn JA, Clayton RN. (1996).** Consensus statement for good practice and audit measures in the management of hypothyroidism and hyperthyroidism. *Br. Med. J*; 313, p 539–544.

**Völkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. (2002).** Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem res toxicol* ; 15, p 1281-1287.

**Völkel W, Bittner N, Dekant W. (2005).** Quantitation of bisphenol a and bisphenol aglucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem-mass spectrometry. *drug metab dispos*; 33, p 1748-1757.

**Völkel W, Kiranoglu M, 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, p 155-162.

**Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, Chapel H. (2007).** 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* 2007; 24, p 131–138.



**Wang Q, Zhang I, Ding Z, Qian W, Lu Q, Wang J. (2015).** Effects of bisphenol a on voltage-dependent t-type calcium channels in mouse testis and epididymis, and the role of estrogen receptors. *Wei sheng yan jiu*;44, p 23-27.

**Wang H, Ding Z, Shi QM, Ge X, Wang HX, Li MX, Chen G, Wang Q, Ju Q, Zhang JP, Zhang MR, Xu LC. (2017).** Anti-androgenic mechanisms of bisphenol a involve androgen receptor signaling pathway. *Toxicology* ; 15, p 10-16.

**Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, Puga A, Knudsen KE. (2002).** The xenoestrogen bisphenol a induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol cancer ther*; 1(7), p 515-524.

**Wetherill YB, Fisher NL, Staubach A, Danielsen M, De Vere White RW, Knudsen KE. (2005)** xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer res* ;65(1), p54-65.

**Waechter J, Thornton C, Markham D, Domoradzki J. (2007).** Factors affecting the accuracy of bisphenol a and bisphenol a-monoglucuronide estimates in mammalian tissues and urine samples. *toxicol mech methods*; 17, p 13-24.

**Walker WH and Cheng J. (2005).** FSH and testosterone signaling in sertoli cells. *reproduct*; 130(1), p 15-28.



**Xu XH, Zhang J, Wang YM, Ye YP, Luo XUQQ. (2010).** Perinatal exposure to bisphenol-a impairs learning-memory by concomitant down-regulation of n-methyl-daspartate receptors of hippocampus in male offspring mice. *Horm behav*; 58 (2), p 326-333.



**Yamauchi R. (1997).** Vitamin e: mechanism of its antioxidant activity. *Food sct technol. Int. Tokyo*, 3 (4),p 301-309,

**Yeung BH, Wan HT, Law AY, Wong CK. (2011).** Endocrine disrupting chemicals: multiple effects on testicular signaling and spermatog; 1(3), p 231-239.

**Yildiz N and Barlas N. (2013).** Hepatic and renal functions in growing male rats after bisphenol a and octylphenol exposure. *Hum exp toxicol*; 32, p 675.

**Yilmaz SA and yilmaz E. (2006).** Effects of melatonin and vitamin e on oxidative–antioxidative status in rats exposed to irradiation. *Toxicol*; 222, p 1–7

**Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H. (1999).** Glucuronidation of the environmental estrogen bisphenol a by an isoform of udp glucuronosyltransferase, ugt2b1, in the rat liver. *Biochem j*; 340,p 405-409

**You L, Zhu X, Shrubsole MJ. (2011).** Renal function, bisphenol a, and alkylphenols: results from the national health and nutrition examination survey (nhanes 2003–2006). *Environ health perspect*;119, p 527–533.



### Z

**Zalko D, Soto AM, Dolo L, Dorio C, Rathahao E, Debrauwer L, Faure R, Cravedi JP. (2003).** Biotransformations of bisphenol a in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant cd1 mice. *Environ health perspect* ; 111(3), p 309-319.

**Zoeller RT. (2005).** Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals. *Mol. Cell. Endocrinol* ; 242,p 10–15.

**Zhu BT, Conney AH (1998).** Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer res*; 58,p 2269–2277.

**Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. (2002).** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the cuzn-sod (sod1), mn-sod (sod2), and ec-sod (sod3) genestructures, evolution, and expression. *Free rad biol med* ; 33, p 337.



# *Annexes*



## Modulatory Role of Selenium and Vitamin E, Natural Antioxidants, against Bisphenol A-Induced Oxidative Stress in Wistar Albinos Rats

Wahiba Amraoui<sup>1,2</sup>, Nesrine Adjabi<sup>2</sup>, Fatiha Bououza<sup>2</sup>, Mahieddine Boumendjel<sup>1</sup>, Faiza Taibi<sup>1</sup>, Amel Boumendjel<sup>1</sup>, Cherif Abdennour<sup>2</sup> and Mahfoud Messarah<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Ecophysiology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

### Abstract

Bisphenol A, an everywhere chemical, is applied as a plasticizer in polycarbonate plastics, which often used in our everyday products and in epoxy resins as protective coatings and linings for food and beverage cans for decades. Human exposure to BPA may lead to adverse effects by interfering with oestrogen receptors. Our present study was conducted to investigate the protective effects of selenium (Se) and vitamin E (Vit E) on BPA-induced damage in the liver of male rats. Animals were randomly divided into four groups: the first group received olive oil and served as control. The second group received both (Se + Vit E) (0.5 mg/kg diet; 100 mg/kg of diet). The third one treated orally by (10 mg/kg b.w) of BPA. The last group received (Se + Vit E) (0.5 mg/kg diet; 100 mg/kg of diet) concomitantly with (10 mg/kg b.w.) BPA. Exposure to BPA for three weeks engendered a hepatic disorder. An increased AST and ALT enzymatic activity was noticed in BPA-treated group as compared to other groups. Furthermore, a change in glucose, cholesterol, LDL-C, HDL-C, albumin, bilirubin level was remarkable. Moreover, exposure to BPA increased malondialdehyde levels while reduced glutathione content was decreased in the liver homogenate. A decrease in glutathione peroxidase, glutathione s-transferase and catalase activities was observed in the same group. Administration of selenium and vitamin E through the diet in BPA treated rats ameliorated the biochemical parameters cited above. In addition, an improvement in activities of liver enzymes was recorded. The histological findings confirmed the biochemical results. The model of this study that we employed characterized the relationships between BPA-induced hepatotoxicity and its alleviation by natural antioxidants like selenium and vitamin E.

**Key words:** Bisphenol A, Selenium, Vitamin E, Hepatotoxicity, Oxidative stress, Rat

### INTRODUCTION

Bisphenol A (4, 4'-isopropylidenediphenol) is one of the most ubiquitous synthetic chemical compounds in the

Correspondence to: Mahfoud Messarah, Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria  
E-mail: mahfoud.messarah@univ-annaba.dz, mmessarahdz@yahoo.fr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

plastic production today (1). Previously, it was used as a synthetic oestrogen usually prescribed to prevent miscarriage in pregnant women (2). Nowadays, it is widely used as an antioxidant component in polycarbonate plastics, epoxy resins and as a coating on metal lids for glass jars and bottles, including containers used for infant recipe (3).

It is mostly acknowledged that BPA has harmful effects on both animal and human health (4,5). Given studies regarding BPA have generally focused on the reproductive system. In mammals, BPA binds and activates the two estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ , though with an affinity 10,000-fold weaker than for their natural ligand 17 $\beta$ -estradiol (6). It may act *via* a G-protein-coupled receptor (GPR30), acting as a trans-membrane estradiol receptor (7). Effects *via*

other ligand nuclear hormone receptors, such as the thyroid hormone receptor, the androgen receptor, and the glucocorticoid receptors, have also been suggested (8). More recently, the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor  $\gamma$  (ERR  $\beta$ ) has been shown to bind BPA at the nanomolar range (5.6 nM) with high specificity (9). Therefore, bisphenol A impairs male fertility and disrupting blood-testis barrier (4,10). In addition, it is related to coronary artery disease and may affect thyroid function (11,12), renal disease and exhibits nephrotoxicity (13), oxidative stress leading to mitochondrial dysfunction in liver (14). However, to date, no clear link between an *in vivo* effect of BPA and one of these different targets has been determined.

The antioxidant defence system of our body depends on large and various protection mechanisms to keep reactive oxygen species (ROS) originating from endogenous or exogenous sources at physiologically optimal levels (15). Natural antioxidants supplementation are largely used to scavenge oxidative impairment induced by these free radicals. Since both Selenium and vitamin E possess biological and antioxidant properties, they are recently used to constrain oxidative damages (16-19). Selenium is a micronutrient required in selenoproteins such as glutathione peroxidase (GPx) which ultimately allows the enzymes to be even more reactive (17,18). On the other hand, vitamin E is a fat-soluble antioxidant essential for the majority of metabolic processes preventing lipid peroxidation. It has a crucial role in anti-inflammatory processes, inhibition of platelet aggregation, and immune enhancement (19,20). Subsequently, vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) is a chain-breaking antioxidant to inhibit the propagation step where the alkyl radical reacts with molecular oxygen at a very high rate, giving a peroxy radical.  $\alpha$ -tocopherol efficiently transfers a hydrogen atom to a lipid free radical;  $\alpha$ -tocopheroxy radicals and stops the chain reaction (21,22). Earlier studies had shown that dietary selenium and vitamin E intake reinforces the level of glutathione peroxidase (23,24). In addition, previous studies were occurred on the protective effects of selenium alone or vitamin E alone on BPA-treated animals. The results showed that selenium or vitamin E ameliorated the toxicity induced by BPA in liver, testis and lungs (25-27). Growing investigations had shown that both selenium and vitamin E are more powerful to scavenge ROS synergistically (16,28,29).

Further, the liver exhibits one of the highest antioxidant enzyme capacity in the body. It is involved in many biological processes including glycogen storage, decomposition of red blood cells, plasma protein synthesis, detoxification and others (30). According to data, this tissue is one of the main targets of the bisphenol A and its metabolites (3,14,31). Thus, the present study was conducted to evaluate lipid peroxidation and oxidative stress induced by BPA in liver rat, and the possible protective effect of selenium and vitamin E supplementation, since it has not yet been

investigated.

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** BPA ( $C_{15}H_{16}O_2$ , CAS # 80-05-7, Sigma Aldrich, MO, USA) is a synthetic oestrogen used as a polymer in the plastics output. IUPAC name: 4, 4'-(propan-2-ylidene) diphenol (Fig. 1). Sodium selenite ( $Na_2SeO_3$ , CAS # 10102-18-8, Sigma Aldrich).  $\alpha$ -Tocophérol ( $C_{29}H_{50}O_2$ , CAS # 59-02-9, Votoquinol Italia, Italy). All other chemical products used in this study were purchased from Sigma Aldrich.

**Experimental design.** Twenty-eight male rats of Wistar strain weighing (250–270 g) were obtained from the Algerian Pasteur Institute (Algiers, Algeria). Food (standard diet, supplied by the ONAB/Food Unit of El-Kseur, Bejaia, Algeria) and water were available *ad libitum*. Animals were acclimated for two weeks under conventional conditions. The experiment took place for three weeks successively, where rodents were randomly assigned into four groups of seven individuals each as follow:

- Groups 1 was orally received olive oil and serving as control
- Groups 2 was received selenium (0.5 mg/kg of diet) and vitamin E (100 mg/kg of diet.)
- Groups 3 treated orally by 10 mg/kg.b.w. of bisphenol A
- Groups 4 was concomitantly administered (Se + vit E) with BPA

The dose of BPA used in this study represents 1/320 of LD50 (10 mg/kg.b.w) which had been used previously by other investigators since it is toxic but not lethal to rats (32). The dose of selenium (0.5 mg/kg of diet) used in our experiment and in other findings gave high protection against stress conditions in several tissues (17,18). The dose of vitamin E (100 mg/kg of diet) gave high protection against toxicity in an earlier study (33).

During treatment, body weight and food intake were recorded periodically during the experiment weeks. After an overnight fast, animals were sacrificed by decapitation and blood samples were immediately collected into tubes without anticoagulant and centrifuged at 5,000 rpm for 5 min. The separated serum was allocated into aliquots for biochemical assays. Later, their livers were carefully removed, weighed and were placed either in a buffer solu-

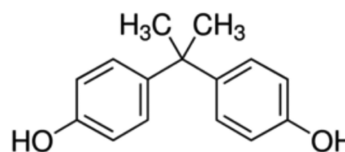


Fig. 1. Chemical structure of bisphenol A.

tion of TBS (Tampon buffered saline, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) at a temperature of 4°C for oxidative damage analysis, or in formol solution (10%) for histopathological studies. One gram of liver was homogenised in 2 mL of TBS by an ultrasound homogeniser. Homogenates were centrifuged at 9,000 rpm for 15 min at 4°C, and the supernatants were divided into aliquots and stored at -20°C before being used. All experiments were fulfilled in accordance with European Commission guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes (33).

**Biochemical assays.** The transaminase activities; aspartate transaminase: AST and alanine transaminase: ALT, albumin as well as total bilirubin, direct bilirubin, glucose, cholesterol, LDL-C (Low Density Lipoprotein Cholesterol), HDL-C (Height Density Lipoprotein Cholesterol) and triglycerides were measured using commercial kits obtained from Spinreact (Barcelona, Spain).

#### **Lipid peroxidation levels and antioxidant status.**

**Estimation of lipid peroxidation:** Malondialdehyde (MDA), which is the final product of polyunsaturated fatty acids oxidation, was assessed as a marker for lipid peroxidation and reacts with thiobarbituric acid (TBA) to produce a red coloured complex, which has peak absorbance at 532 nm. Thus, 125 µL of supernatant were homogenized by sonication with 50 µL of PBS, 125 µL of TCA-BHT (trichloroacetic acid-butylhydroxytoluene) in order to precipitate proteins, and then centrifuged (1,000 rpm for 10 min, at 4°C). Afterwards, 200 µL of supernatant were mixed with 40 µL of HCl (0.6 M) and 160 µL of TBA dissolved in Tris, and then the mixture was heated at 80°C for 10 min. The absorbance of the resultant supernatant was obtained at 530 nm. The amount of TBARS was calculated using a molar extinction coefficient of  $1.56 \times 10^5$  M/cm (34).

**Reduced glutathione level:** Analysis of GSH level was based on the development of a yellow colour when DTNB is added to components having sulfhydryl groups (35). In brief, 200 µL of 0.25% sulphosalicylic acid was added to 800 µL of organ supernatant and tubes were centrifuged at 1,000 rpm for 15 min. Supernatant 500 µL was mixed with 1,000 µL phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 25 µL of DTNB (10 mM). Finally, absorbance at 412 nm was recorded. Total GSH content was expressed as (nmol GSH/mg protein).

**Assays of glutathione-S-transferase:** The measurement of the activity of GST is based on the conjugation reaction of glutathione and 1-chloro, 2,4-dinitrobenzene (C-DNB) which results a new molecule that absorbs light at 340 nm (36).

**Assay of glutathione peroxidase activity:** The Supernatant obtained after centrifuging 5% of the liver at 10,000

rpm for 30 min at 4°C was used for GPx assay. Reaction mixture of 1,000 µL was prepared which contained 300 µL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), 200 µL of GSH (2 mM), 100 µL of sodium azide (10 mM), 100 µL of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (1 mM) and 300 µL of tissue supernatant. After incubation at 37° for 15 min, the reaction was terminated by the addition of 500 µL of TCA (5%). Tubes were centrifuged at 1,500 g for 5 min and the supernatant was collected. Totally, 200 µL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 700 µL of DTNB (0.4 mg/mL) were added to 100 µL of reaction supernatant. After mixing, absorbance was recorded at 420 nm (37).

**Assay of catalase activity:** The reaction was started by adding 20 µL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 M) to 200 µL of supernatant and 780 µL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). Later, the decomposition was monitored by following the decrease in absorbance at 240 nm for 1 min. The enzyme activity was calculated by using an extinction coefficient of 0.043 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (38).

**Protein assay:** The protein content of supernatant was spectro-photometrically estimated using bovine serum albumin as standard (39).

**Histopathological examination:** The liver was dissected and was weighed in order to calculate organ/body weight ratio for each animal. After weighing, tissue samples were fixed in 10% formol and proceed to routine histopathological process. Then, they were dehydrated in 70~100% ethanol series and were embedded in the paraffin baths at 58°C for paraffin inclusion. Sections of 4~6 µM were prepared from paraffin blocks using a Leica Rotary Microtomy (Wetzlar, Germany). These sections were then stained with Hematoxylin-Eosin (H-E) according to standards. All slides were evaluated and photographed under a light microscope (Leica DM 500, Leica light microscope, Wetzlar, Germany).

**Statistical analysis:** All the results were expressed as Mean value ± SEM. Data comparisons were carried out by using one way analysis of variance followed by post hoc of tukey test to compare means between the different treated groups. Differences were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

**Effect of treatments on both body, absolute and relative weight of liver.** Body weight of treated rodents with bisphenol A was increased significantly compared to untreated animals (13% to 8.16%). After the first week of treatment, rodents progressively gained weight until 331g at the end of the experiment. Whereas, the body weight was maintained normally in the mixture group [BPA + (Se + Vit E)] even lower than the control and (Se + Vit E) groups (Table 1). However, absolute and relative weight of liver did not reveal any change between different groups.

**Table 1.** Effects of treatments on body weight (g), absolute (g) and relative liver weights (g/100 g bw), daily food intake (g) in experimental groups

Parameters	Control	(Se + Vit E)	BPA	BPA/(Se + Vit E)
Initial body weight (g)	275.66 ± 4.2 <sup>a</sup>	271.83 ± 2.91 <sup>a</sup>	270.25 ± 2.51 <sup>a</sup>	270.5 ± 2.31 <sup>a</sup>
Final body weight (g)	300 ± 5.94 <sup>b</sup>	310.62 ± 6.91 <sup>b</sup>	345.5 ± 9.4 <sup>a</sup>	291.75 ± 5.3 <sup>b</sup>
Body gain weight (%)	8.16 ± 2.35 <sup>b</sup>	8.87 ± 1.51 <sup>b</sup>	19 ± 2.03 <sup>a</sup>	3.8 ± 2.13 <sup>b</sup>
Absolute liver weight (g)	8.12 ± 0.58 <sup>a</sup>	7.92 ± 0.36 <sup>a</sup>	8.374 ± 0.35 <sup>a</sup>	8.28 ± 0.3 <sup>a</sup>
Relative liver weight(g/100 g bw)	2.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.934 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.63 ± 0.05 <sup>a</sup>
Food intake (g/day/rat)	19.75 ± 0.77 <sup>a</sup>	21.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	17.62 ± 1 <sup>b</sup>	17.09 ± 2.7 <sup>b</sup>

Values are given as mean ± SEM for groups of 7 animals each.

<sup>a-c</sup>Means in a row without a common superscript letter differ ( $p < 0.05$ ) as analyzed by two-way ANOVA and the TUKEY test.

**Table 2.** Effects of treatments on plasma biochemical parameters of control and treated rats

Parameters	Control	(Se + Vit E)	BPA	BPA/(Se + Vit E)
Glucose (g/L)	1.31 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.54 ± 0.07 <sup>b,a</sup>	1.65 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.08 <sup>b,a</sup>
Cholesterol (g/L)	0.98 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.32 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.04 <sup>b</sup>
LDL-C (g/L)	0.13 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>b</sup>
Triglycerides (g/L)	0.49 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.80 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.02 <sup>b</sup>
HDL-C (g/L)	0.28 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>a,b</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>a,b</sup>
Albumin (g/L)	33.74 ± 1.25 <sup>a</sup>	30.76 ± 0.94 <sup>a</sup>	29.19 ± 0.72 <sup>b</sup>	33.69 ± 0.83 <sup>a</sup>
Total bilirubin (mg/dL)	2.11 ± 0.02 <sup>c</sup>	2.14 ± 0.04 <sup>c</sup>	2.49 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.117 <sup>b</sup>
Direct bilirubin (mg/dL)	0.14 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>a</sup>
ALT (U/L)	107.71 ± 3.78 <sup>b</sup>	124.29 ± 5.26 <sup>b</sup>	155.71 ± 5.15 <sup>a</sup>	131 ± 4.14 <sup>a</sup>
AST (U/L)	89.14 ± 4.38 <sup>c</sup>	93.29 ± 5.67 <sup>c</sup>	132.43 ± 6.09 <sup>a</sup>	115 ± 4.42 <sup>b</sup>

Values are given as mean ± SEM for groups of 7 animals each.

<sup>a-c</sup>Means in a row without a common superscript letter differ ( $p < 0.05$ ) as analyzed by two-way ANOVA and the TUKEY test.

LDL-C: Low Density Lipoprotein Cholesterol; HDL-C: Height Density Lipoprotein Cholesterol; ALT: Alanine Transaminase; AST: Aspartate Transaminase.

**Effect of treatments on biochemical profile.** In Table 2, rats treated for 3 weeks with BPA had a higher concentration of blood sugar compared to the control animals. However, no significant change was found statistically in the mean of the groups: (Se + Vit E) and [BPA/(Se + Vit E)] compared to control group. Our data showed that chronic exposure to BPA had engendered a hepatic disorder. Where albumin was significantly declined in the BPA-treated group compared to control. Whereas, total bilirubin concentration was significantly increased in the same group with no change in the direct bilirubin as compared to non-treated rodents. Furthermore, the enzymatic activity of AST and ALT had shown a significant increase in the BPA-treated rodents compared to the control ones. Likewise, lipid profile of BPA-treated rats presented a significant increase in total cholesterol, triglycerides and LDL-C levels while the level of HDL-C was decreased.

On the other hand, selenium and vitamin E supplementation significantly improved those dosed parameters above. Indeed, total and direct bilirubin had shown a significant decrease as well as the enzymatic activity of AST and ALT. Likewise, total cholesterol, triglycerides and LDL-C were decreased. However, albumin revealed a recovery

compared to the BPA-treated group.

**Effect of treatments on lipid peroxidation and glutathione contents.** As shown in Table 3, a significant increase in MDA level, the indicator of lipid peroxidation, after the administration of BPA to rats as compared to control ones. While rats treated concomitantly with BPA and (Se + Vit E) showed a significant decrease in MDA concentration as compared to BPA-treated group. On the other hand, BPA-treated rats showed a significant decline in glutathione content (GSH) as compared to controls. Nonetheless, selenium and vitamin E co-treatment to BPA significantly enhanced GSH content when compared to BPA-treated group. Yet, this recovery of GSH still lower than normal level.

**Effect of treatments on antioxidants enzymes activities.** Data concerning antioxidant enzymes activity presented in the Table 3, showed a significant decline in the GPx, CAT and GST activities following a treatment with BPA. Yet, a non-significant increase was noticed in the group receiving dietary (Se + Vit E) as compared to control. While rats administered BPA and (Se + Vit E) concomitantly showed a recovery as compared to BPA-

**Table 3.** Effects of treatments on MDA and GSH levels, and liver antioxidant enzymes activities of control and treated rats

Parameters	Control	(Se + Vit E)	BPA	BPA/(Se + Vit E)
MDA (nmol/mg prot.)	0.89 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.248 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.05 <sup>a,b</sup>
GSH (nmol/mg prot.)	141.1 ± 14.20 <sup>a</sup>	130.42 ± 3 <sup>a</sup>	93.02 ± 5 <sup>b</sup>	124.84 ± 7.57 <sup>a</sup>
GPx (nmoles GSH/min/mg prot.)	320.2 ± 11.6 <sup>a</sup>	290.27 ± 9 <sup>a</sup>	192.2 ± 10.1 <sup>c</sup>	229.4 ± 6.38 <sup>b</sup>
GST (nmol C-DNB/min/mg prot.)	15.48 ± 0.4 <sup>a</sup>	15.31 ± 0.27 <sup>a</sup>	7.37 ± 0.25 <sup>b</sup>	11.03 ± 0.55 <sup>a</sup>
CAT (μmoles H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg prot.)	120.52 ± 5.61 <sup>a</sup>	125.6 ± 4.56 <sup>a</sup>	95.06 ± 5.9 <sup>b</sup>	115.19 ± 6.24 <sup>b</sup>

Values are given as mean ± SEM for groups of 7 animals each.

<sup>a-c</sup>Means in a row without a common superscript letter differ ( $p < 0.05$ ) as analyzed by two-way ANOVA and the TUKEY test.

**Table 4.** Semi-quantitative recording of architectural damage on histopathological analysis of the liver of control and treated rats

Parameters	Treatment groups			
	Control	(Se + Vit E)	BPA	BPA/(Se + Vit E)
Degeneration of hepatocytes	–	–	++	–
Congestions of hepatoportal blood vessels	–	–	++	+
Inflammatory infiltration	–	+	+++	+
Necrotic foci	–	–	++	–

(–) indicates normal, (+) indicates mild, (++) indicates moderate, and (+++) indicates severe.

treated group yet it is inferior to control groups.

**Effect of treatments on hepatic histology.** A liver section of control rat showing a healthy parenchyma, normal hepatic plates radiating from a thin walled central vein (green arrow) separated by blood sinusoids lined by endothelial cells. While, the liver tissue of BPA treated rats shows congestions of hepatoportal blood vessels (blue arrow), inflammatory infiltrations (black arrow) and degeneration of hepatocytes (asterisk) with necrotic foci scattered throughout the liver (N). Liver section of both (Se + Vit E) and the fourth group where rats received both dietary Selenium and vitamin E with BPA showed less inflammatory infiltrations as compared to treated rats with only BPA (Fig. 2). The histopathological changes are graded and summarized in Table 4. Histological grading was made according to four severity grades: – (none); + (mild); ++ (moderate) and +++ (severe).

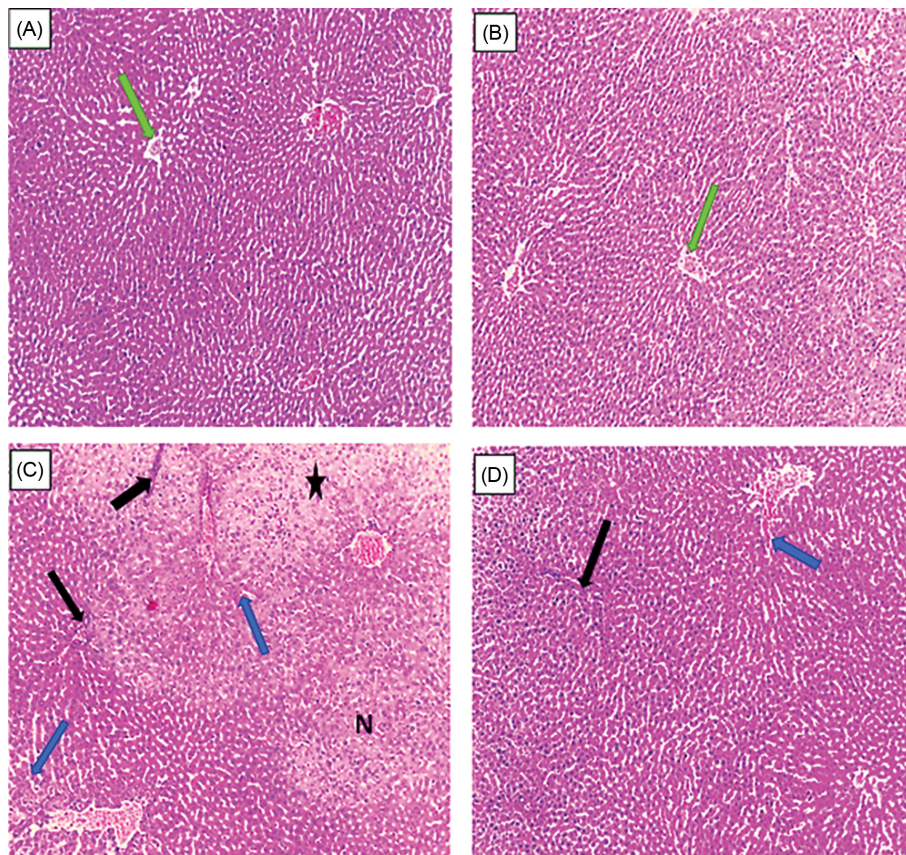
## DISCUSSION

The present study was carried out to determine the antioxidant capacities of both selenium and vitamin E to restore the hepatic damage induced by bisphenol A to male rats. Our results showed a significant increase in the energetic profile parameters such as glucose, cholesterol, LDL-C and triglycerides associated with an overweight following BPA administration compared to non-treated rats. In another hand, relative and absolute liver weight remained unchanged in all dosage groups as compared with the control animals. This is in line with some previous observations in human populations where elevated concentration of urinary BPA was associated with an

increased waist circumference as an abdominal obesity factor in Korean adults (5). It seems to down control adipose tissue metabolism, endocrine hormone systems, and the central hypothalamic-pituitary-adrenal axis (40). Specifically, it has been found that low concentrations of BPA induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells (41). However, these findings were not accorded with some studies that have reported a decreased body weight in response to developmental BPA exposures (42), and some others have found no significant effects on body weight, relative or absolute liver weight (43).

As well, activity of enzymes liver function such as aspartate transaminase and alanine transaminase and total bilirubin level was increased comparably to the control rats. Previous studies reported same findings where increased doses of BPA increased the biochemical levels of ALT, AST, ALP and total bilirubin (44,45). However, after being fed with selenium and vitamin E concomitantly with BPA, a recovery of balance was noticed comparing to control rodents. Which endorse the powerful effects of both selenium and vitamin E to restore the hepatic toxicity of reactive oxygen species generated by several environmental pollutants including BPA (46,47). In fact, there is a growing evidence that nutritional supplements are the essential elements in almost all biological systems and could provide an important dietary source of antioxidants. They latter constrain membrane lipids peroxidation by scavenging lipid peroxy radicals, and is consequently converted into  $\alpha$ -tocopheroxyl radical (16,17).

It is acknowledged that hepatic GSH (L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine) acts as an electrophile, radical scavenger, and a redox partner. GSH may also serve as a



**Fig. 2.** Histologic sections stained with Hematoxylin-Eosin (H&E) show the liver of the experimental groups: (A) control rats, (B) (Se + Vit E) treated rats, (C) BPA treated rats, (D) (Se + Vit E)/BPA treated rats. (A) Liver section of control rats showing a healthy parenchyma, normal hepatic plates radiating from a thin walled central vein (green arrow) separated by blood sinusoids lined by endothelial cells, polyhedral hepatocytes contained rounded vesicular nuclei  $\times 100$ . (B) Liver section of (Se + Vit E) treated rats showing a healthy hepatic architecture  $\times 100$ . (C) The histo-architecture of the liver tissue of BPA treated rats shows congestions of hepatoportal blood vessels (bleu arrows), inflammatory cellular infiltrations (black arrow) and degeneration of hepatocytes (asterisk) with necrotic foci scattered throughout the liver (N)  $\times 100$ . (D) The liver section of (Se + Vit E)/BPA treated rats show few inflammatory cellular infiltrations (black arrow)  $\times 100$ .

cofactor for several drug-metabolizing enzymes (i.e., GSTs) where it is consumed, or for antioxidant enzymes (i.e., GPx) where it serves as a redox partner (47). During oxidation, GSH forms a dimer, glutathione disulfide (GSSG), which, in turn, can be reduced by the enzyme GR at the expense of NADPH (48). The reduction in activities of antioxidant enzymes in our study is in line with several studies that reported same disorders (49). The failure of the primary antioxidant system to act against free radicals generated may reflect the inability of liver mitochondria and microsomes to eliminate hydrogen peroxide produced after exposure to bisphenol A. This may also be due to enzyme inactivation caused by excess ROS production in mitochondria and microsomes (31). These findings are linked to histopathological changes in treated animals. Where, liver tissue of BPA treated rats shows congestions of hepatoportal blood vessels (blue arrow), inflammatory infiltrations (black arrow) and degeneration of hepato-

cytes (asterisk) with necrotic foci scattered throughout the liver (N). Although, experimental studies have shown that BPA is rapidly metabolized and excreted in rodents (50). It was reported an accumulation of bisphenol A in several target organs (brain, gonads and liver) following three oral doses (0.1, 10 or 100 mg/kg) of  $^{14}\text{C}$ -bisphenol A in Fischer 344 female rats (51). In addition, previous studies confirm that human environmental exposure to BPA is continuously as an inhaled or swallowed dust or by ingestion of migrated polymer from polycarbonates (52,53).

Dietary Selenium and vitamin E attenuated the above findings. Antagonism between (Se and Vit E) and BPA was noticed where a decline of lipid peroxidation and a recovery of antioxidant enzymatic activities of GPx, GST and CAT were recorded in the fourth group. This amelioration is reflected by a reduced inflammatory infiltration in the hepatic tissue. In a previous study, it was reported that selenium effectively reinforces cellular antioxidant

activity against atrazine-induced changes in rats by increasing hepatic glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase activity, and ascorbate content while hepatic catalase activities decreased (47-49). In addition, previous studies demonstrated crucial effects of selenium and vitamin E in synergy (16,25,29,50-55), selenium alone (17,18) and vitamin E alone (19,20,56). Therefore, an earlier study reported that selenium-deficiency and vitamin E-deficiency are susceptible to induce body functional abnormalities such as haemolysis of erythrocytes (57,58). Collectively, co-treatment of selenium and vitamin E revealed a significant reduction in lipid peroxidation content and an improvement in GSH level. In addition, a reinforcement of enzymatic activities of the liver was found. Nonetheless, more studies are needed to evaluate their repairing capacities on histopathological changes.

### ACKNOWLEDGMENTS

The present research was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, Directorate General for Scientific Research and Technological Development through the Research Laboratory "Laboratory of Biochemical and Environmental Toxicology" Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria.

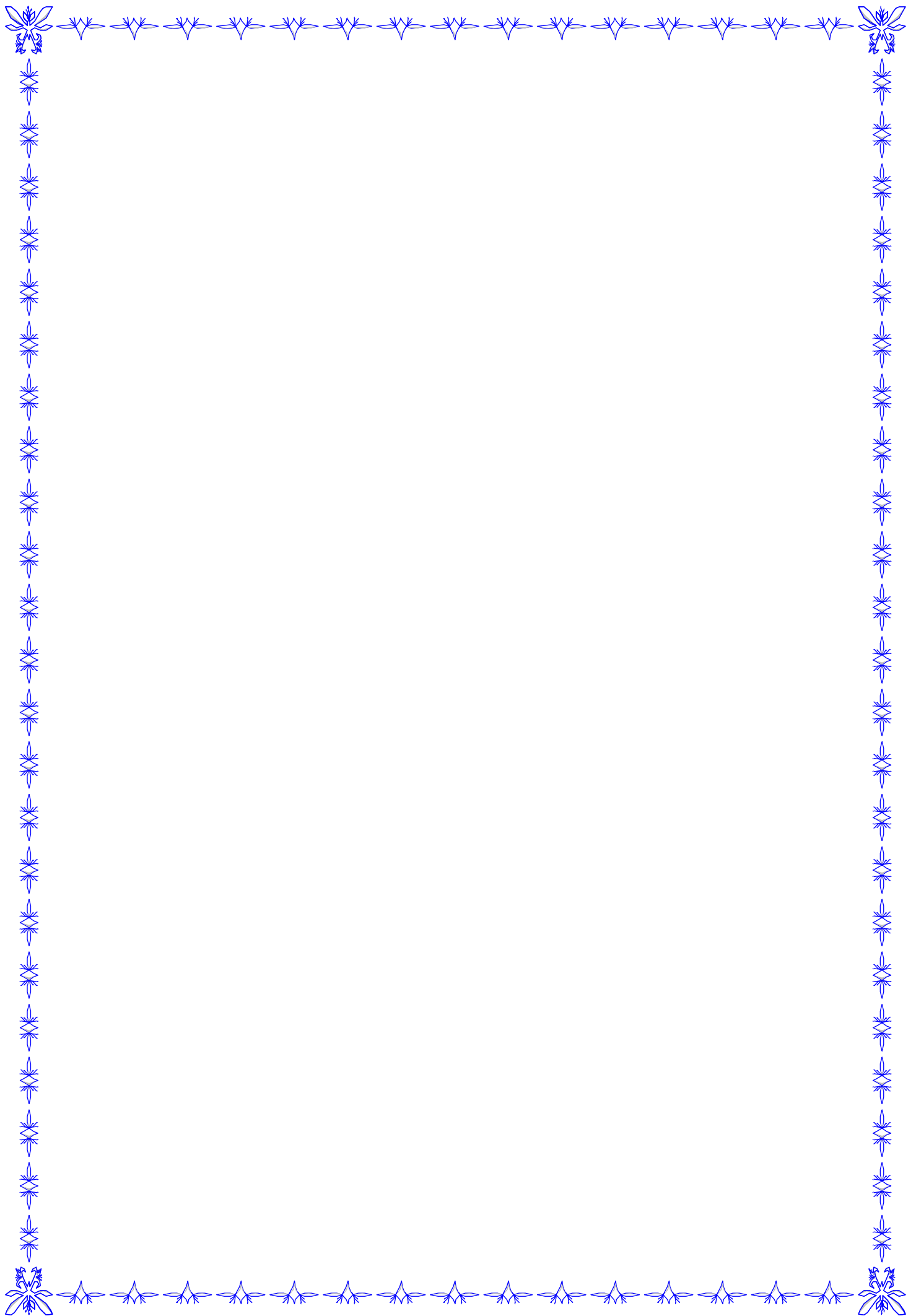
Received November 10, 2017; Revised April 26, 2018; Accepted April 30, 2019

### REFERENCES

- INRS (2016) Fiche Toxicologique N° 279 Edition 03/11/2013 Et Le 01/01/2016. Available from: <http://www.Inrs.Fr/Fichetox/>.
- Takeshita, A., Koibuchi, N., Oka, J., Taguchi, M., Shishiba, Y. and Ozawa, Y. (2001) Bisphenol-A, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear receptor, steroid and xenobiotic receptor-mediated transcription. *Eur. J. Endocrinol.*, **145**, 513-517.
- Kang, J.H., Kondo, F. and Katayama, Y. (2006) Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, **226**, 79-89.
- Anjum, S., Rahman, S., Kaur, M. and Ahmad, F. (2011) Melatonin ameliorates bisphenol a-induced biochemical toxicity in testicular mitochondria of mouse. *Food Chem. Toxicol.*, **49**, 2849-2854.
- Ko, A., Hwang, M.S., Park, J.H., Kang, H.S., Lee, H.S. and Hong, J.H. (2014) Association between urinary bisphenol A and waist circumference in Korean adults. *Toxicol. Res.*, **30**, 39-44.
- Routledge, E.J., White, R., Parker, M.G. and Sumpter, J.P. (2000) Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ER beta. *J. Biol. Chem.*, **275**, 35986-35993.
- Bouskine, A., Nebout, M., Brucker-Davis, F., Benahmed, M. and Fenichel, P. (2009) Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ. Health Perspect.*, **117**, 1053-1058.
- Sargis, R.M., Johnson, D.N., Choudhury, R.A. and Brady, M.J. (2010) Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obesity*, **18**, 1283-1288.
- Takayanagi, S., Tokunaga, T., Liu, X.H., Okada, H., Matsu-shima, A. and Shimohigashi, Y. (2006) Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERR gamma) with high constitutive activity. *Toxicol. Lett.*, **167**, 95-105.
- D'Cruz, S.C., Jubendradass, R., Jayakanthan, M., Rani, S.J. and Mathur, P.P. (2012) Bisphenol A impairs insulin signaling and glucose homeostasis and decreases steroidogenesis in rat testis. *Food Chem. Toxicol.*, **50**, 1124-1133.
- Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S. and Soto, A.M. (2009) Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr. Rev.*, **30**, 75-95.
- Melzer, D., Rice, N.E., Lewis, C., Henley, W.E. and Gallo-way, T.S. (2010) Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS ONE*, **5**, e8673.
- Krieter, D.H., Canaud, B., Lemke, H.D., Rodriguez, A., Morgenroth, A., von Appen, K., Dragoun, G.P. and Wanner, C. (2013) Bisphenol A in chronic kidney disease. *Artif. Organs*, **37**, 283-290.
- Ronn, M., Kullberg, J., Karlsson, H., Berglund, J., Malmberg, F., Orberg, J., Lind, L., Ahlström, H. and Lind, P.M. (2013) Bisphenol A exposure increases liver fat in juvenile fructose-fed Fischer 344 rats. *Toxicology*, **303**, 125-132.
- Schieber, M. and Chande, N.S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress review. *Curr. Biol.*, **24**, R453-R462.
- Cemek, M., Büyükkuroğlu, M.E., Büyükben, A., Aymelek, F. and Özcan, L. (2010) Effects of vitamin E and selenium on tissue bio-element status in organophosphate toxicity of rats. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **98**, 9-18.
- Ognjanovic, B.I., Markovic, S.D., Pavlovic, S.Z. and Zikic, R.V. (2008) Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effect of selenium. *Physiol. Res.*, **57**, 403-411.
- Ben Amara, I., Fetoui, H., Guermazi, F. and Zeghal, N. (2009) Dietary selenium addition improves cerebrum and cerebellum impairments induced by methimazole in suckling rats. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **27**, 719-726.
- Bansal, A.K., Bansal, M., Soni, G. and Bhatnagar, D. (2005) Protective role of Vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. *Chem. Biol. Interact.*, **156**, 101-111.
- Al-Attar, A.M. (2011) Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice. *Saudi. J. Biol. Sci.*, **18**, 63-72.
- Messarah, M., Amamra, W., Boumendjel, A., Barkat, L., Bouasla, I., Abdenour, C., Boulakoud, M.S. and El Feki, A. (2013) Ameliorating effects of curcumin and vitamin E on diazinon-induced oxidative damage in rat liver and erythrocytes. *Toxicol. Ind. Health*, **29**, 77-88.

22. Bowry, V.W., Ingold, K.U. and Stocker, R. (1992) Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this anti-oxidant becomes a pro-oxidant. *Biochem. J.*, **288**, 341-344.
23. Scott, L.D., Kelleher, J. and Losowsky, M.S. (1977) The influence of dietary selenium and vitamin e on glutathione peroxidase and glutathione in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **497**, 218-224.
24. Abdel Samie, H.A., Nassar, S. A. and Hussein, Y. (2013) Ameliorative potential of selenium against bisphenol A-induced hepatotoxicity in rats. *Egypt. J. Hosp. Med.*, **67**, 444-454.
25. Chow, C.K. (1990) Effect of dietary vitamin E and selenium on rats: pyruvate kinase, glutathione peroxidase and oxidative damage. *Nutr. Res.*, **10**, 183-194.
26. Fang, Y., Zhou, Y., Zhong, Y., Gao, X. and Tan, T. (2013) Effect of vitamin E on reproductive functions and anti-oxidant activity of adolescent male mice exposed to bisphenol A. *Wei Sheng Yan Jiu*, **42**, 18-22.
27. Abedelhaffez, A.S., Abd El-Aziz, E.A., Abdel Aziz, M. and Ahmed, A.M. (2017) Lung injury induced by bisphenol A: a food contaminant is ameliorated by selenium supplementation. *Pathophysiology*, **24**, 81-89.
28. Nazıroglu, M., Karaoglu, A. and Aksoy, A.O. (2004) Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology*, **195**, 221-230.
29. Ben Amara, I., Soudani, N., Troudi, A., Bouaziz, H., Boudawara, T. and Zeghal, N. (2011) Antioxidant effect of vitamin E and selenium on hepatotoxicity induced by dimethoate in female adult rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **74**, 811-819.
30. Mulaikal, J. and Emond, C. (2012) Physiology and Anatomy of the Liver (Gebhard, W. Eds.). Gebhard Wagener Editor, MD, pp. 3-20.
31. Nakagawa, Y. and Tayama, S. (2000) Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.*, **74**, 99-105.
32. El-Beshbishy, H.A., Aly, H.A. and El-Shafey, M. (2012) Lipoic acid mitigates bisphenol a-induced testicular mitochondrial toxicity in rats. *Toxicol. Ind. Health*, **29**, 875.
33. European Commission (2007) Commission Recommendations of 18 June 2007 on Guidelines for the Accommodation and Care of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Annex II to European Council Directive 86/609. 2007/526/EC.
34. Buege, J.A. and Aust, S.D. (1984) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **105**, 302-310.
35. Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
36. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974) Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139.
37. Flohe, L. and Gunzler, W.A. (1984) Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, **105**, 114-121.
38. Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.*, **105**, 121-126.
39. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
40. Vom Saal, F.S., Nagel, S.C., Coe, B.L., Angle, B.M. and Taylor, J.A. (2012) The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **354**, 74-84.
41. Huc, L., Lemarié, A., Guéraud, F. and Héliers-Toussaint, C. (2012) Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro*, **26**, 709-717.
42. Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D.L., Katsu, Y., Watanabe, H. and Iguchi, T. (2002) Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol.*, **16**, 117-122.
43. Ryan, B.C. and Vandenberg, J.G. (2006) Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Horm. Behav.*, **50**, 85-93.
44. Korkmaz, A., Ahabab, M.A., Kolankaya, D. and Barlas, N. (2010) Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 2865-2871.
45. Hassan, Z.K., Elobeid, M.A., Virk, P., Omer, S.A., ElAmin, M., Daghestani, M.H. and AlOlayan, E.M. (2012) Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2012**, 194829.
46. Helal, E.G.E., Taha, N.M., Ahmed, M.M. and Abu-Taleb, H.M. (2016) Ameliorative effect of vitamin E on oxidative stress induced by bisphenol A in female albino rats. *Egypt. J. Hosp. Med.*, **65**, 474-478.
47. Favier, A. (2003) Oxidative stress: conceptual and experimental interest in comprehension mechanism of diseases and therapeutic potentiel. Biochemical mechanism. *L'actualité Chimique*, **5**, 108-115.
48. Sorg, O. (2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *C. R. Biol.*, **327**, 649-662.
49. Yıldız, N. and Barlas, N. (2013) Hepatic and renal functions in growing male rats after bisphenol A and octylphenol exposure. *Hum. Exp. Toxicol.*, **32**, 675-686.
50. Kurebayashi, H., Betsui, H. and Ohno, Y. (2003) Disposition of a low dose of 14C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol. Sci.*, **73**, 17-25.
51. Kim, C.S., Sapienza, P.P., Ross, I.A., Johnson, W., Luu, H.M. and Hutter, J.C. (2004) Distribution of bisphenol A in the neuroendocrine organs of female rats. *Toxicol. Ind. Health*, **20**, 41-50.
52. Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O'Block, S.T. and Harris, L.R. (1998) A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, **36**, 2149-2173.
53. Adebukola, C., Adesiyun, A., Titilola, O., Oyejola, M.O. and Farombi, E.O. (2011) Selenium provides protection to the liver but not the reproductive organs in an atrazine-model of experimental toxicity. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **63**, 201-207.
54. El-Demerdash, F.M. (2004) Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **18**, 113-121.
55. Gueroui, M. and Kechrid, Z. (2016) Evaluation of some bio-

- chemical parameters and brain oxidative stress in experimental rats exposed chronically to silver nitrate and the protective role of vitamin e and selenium. *Toxicol. Res.*, **32**, 301-309.
56. Lee, J. (2010) Use of antioxidants to prevent cyclosporine a toxicity. *Toxicol. Res.*, **26**, 163-170.
57. Messarah, M., Klibet, F., Boumendjel, A., Abdennour, C., Bouzerna, N., Boulakoud, M.S. and El Feki, A. (2012) Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **64**, 167-174.
58. Djeflal, A., Messarah, M., Boumendjel, A., Kadeche, L. and El Feki, A. (2015) Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicol. Ind. Health*, **31**, 31-43.





## Certificate of Participation

We affirm that

**Mr, Mrs : Amraoui Wahiba**

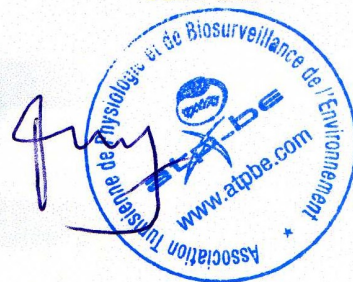
has presented a **poster presentation** entitled

« **Bisphenol a may impair the renal function of male rats** »

At the V<sup>th</sup> International Congress of Physiology and Environmental Biomonitoring  
(ATPBE'2016) 18-21 December 2016, Hammamet, Tunisia

**Scientific committee**

**ATPBE**



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ M'HAMED BOUGARA – BOUMERDES  
FACULTÉ DES SCIENCES  
DÉPARTEMENT DE CHIMIE  
en collaboration avec le  
LABORATOIRE DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE



1<sup>ère</sup> Journée Nationale de l'Agro-alimentaire,  
Engineering et environnement  
-Le 16 Avril 2017-



## ATTESTATION


Le comité d'organisation de la 1<sup>ère</sup> Journée Nationale de l'Agro-alimentaire, Engineering et Environnement, atteste que :

Mme **AMRAOUI Wahiba** a présenté une *Communication Affichée* intitulée

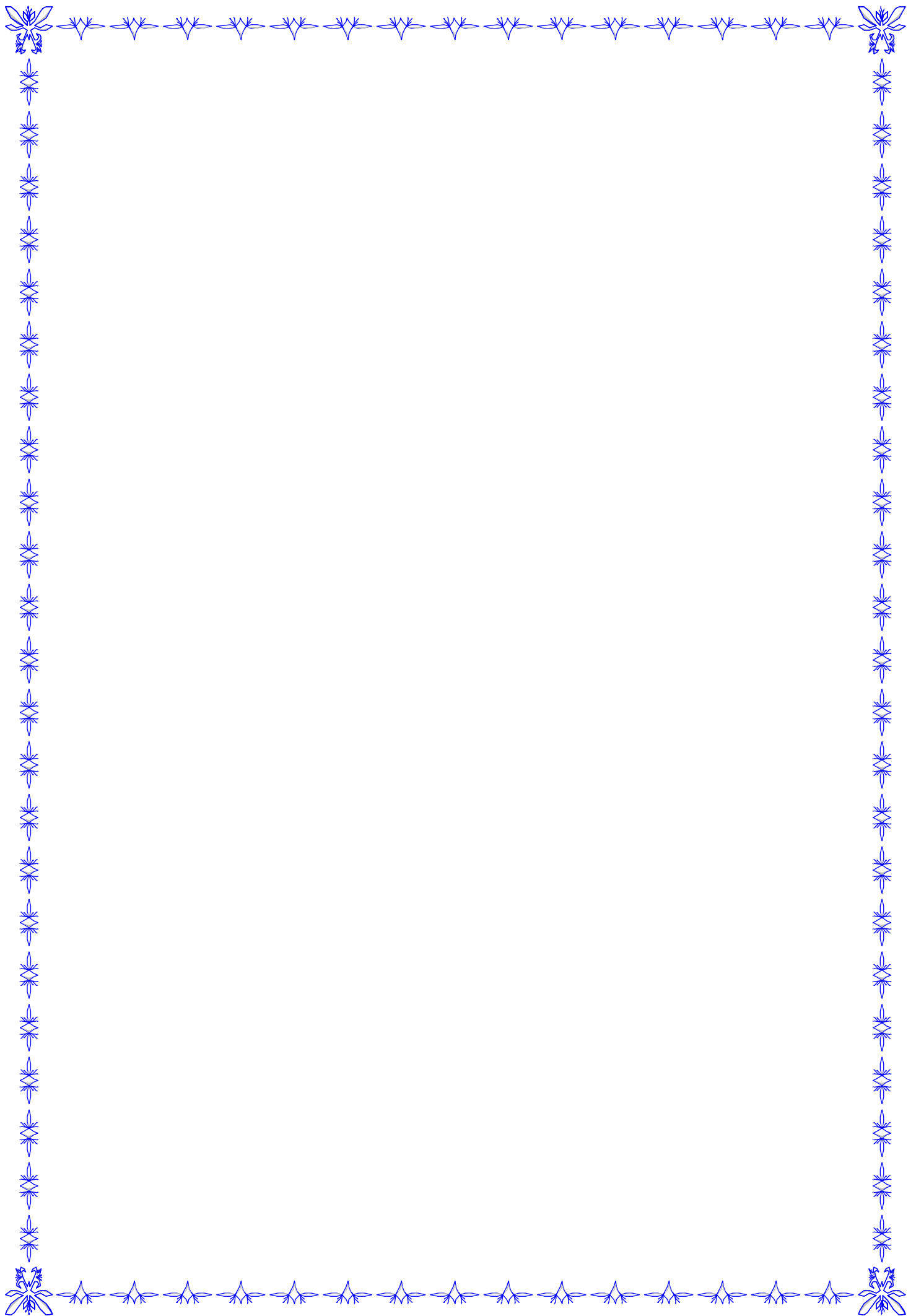
« *Bisphenol A generates oxidative stress: hematological and biochemical approach in rats.* »

Co-auteurs: Adjabi Nesrine ,Bououza Fatiha  
Boumendjel Amel , Messarah Mahfoud

La Présidente du séminaire

  
Mme. YAHIAOUI Karima  
Présidente JNAEE - 2017

  
2017  
JNAEE



## I. Fiches techniques Kit Spin react (Espagne)

### 1.1. Bilan de la fonction hépatique :

#### 1.1.1. Dosage de la glycémie :

##### ➤ Réactifs

<b>Réactif 1 : Tampon</b>	Tris pH 7.4 Phénol	92 mmol/L 0.3 mmol/L
<b>Réactif 2 : Enzymes</b>	Glucose oxydase (GOD) Peroxydase (POD) 4-Aminophenazone (4-AP)	15000 U/L 1000 U/L 2.6 mmol/L
<b>Glucose calibrant</b>	Glucose aqueux (standard)	100 mg/dL

##### ➤ Préparation du réactif de travail :

- Dissoudre le contenu du réactif 2 dans le flacon du réactif 1 et mélanger légèrement.

##### ➤ Mode opératoire

	<b>Blanc</b>	<b>Etalon</b>	<b>Echantillon</b>
<b>Réactif de travail (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Etalon (µl)</b>	--	10	--
<b>Echantillon (µl)</b>	--	--	10

- Mélanger, incuber pendant 10 min à 37°C, ou 15 à 20 min à une température ambiante.
- Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 505 nm.
- La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

- **Calcul de la concentration** : La concentration du glucose est calculée par la formule suivante :

$$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (100 mg/dl)}$$

### 1.1.2. Dosage de l'Albumine :

#### Réactif :

<b>R</b>	Vert de bromocrésol pH 4,2	0,12 mmol/L
<b>ALBUMINE CAL</b>	Étalon primaire de détection de l'albumine 5 g/dL	

- **Préparation du réactif de travail** : Le réactif et l'étalon sont prêts à l'emploi.
- **Mode opératoire** :

	Blanc	Étalon	Echantillon
R (mL)	1,0	1,0	1,0
Modèle (Remarque 1,2) (µL)	--	5	--
Echantillon (µL)	--	--	5

- Mélanger et incuber pendant 5 min. à 37°C ou 10 min. à 15-25°C.
- Lire l'absorbation (a) du patron et l'échantillon, en comparaison avec le blanc du réactif. La couleur reste stable pendant 1 heure à température ambiante

#### Calcul :

$$\text{Albumine (g/l)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon}$$

### 1.1.3. Dosage de la bilirubine :

➤ *Les réactifs*

<b>R 1 (D)</b>	Acide sulfonique Acide hydro chlorhydrique	30 mmol/l 150 mmol/l
<b>R 2 (T)</b>	Acide sulfonique Acide hydro chlorhydrique Dimethyl sulfoxide (DMSO)	30 mmol/l 50 mmol/l 7 mol/l
<b>R 3</b>	Nitrite de sodium	29 mmol/l
<b>Facultatif</b>	Bilirubine standard	Ref : 1002250

➤ *Préparation du réactif de travail* : Les réactifs sont prêts à l'emploi.

➤ *Mode opératoire* :

	<b>Blanc</b>	<b>B totale</b>	<b>Blanc</b>	<b>B directe</b>
<b>R 1 (D) (ml)</b>	--	--	1.5	1.5
<b>R 2 (T) (ml)</b>	1.5	1.5	--	--
<b>R 3 (µl)</b>	--	50	--	50
<b>Echantillon / Standard (µl)</b>	100	100	100	100

- Mélanger et incuber pendant 15 minutes à 15-25°C.
- Mesurer l'absorbance (A) à 555 nm.

## Calcul

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

$$\text{Facteur} = \frac{\text{Concentration du standard}}{(A) \text{ Standard} - (A) \text{ Blanc}}$$

$$\text{Facteur théorique} \begin{cases} \text{Bilirubine totale} = 19.1 \\ \text{Bilirubine directe} = 14 \end{cases}$$

## 1.1.4. Dosage du cholestérol :

## ➤ Les réactifs

<b>R 1 tampon</b>	PIPES pH 6.9 Phénol	90 mmol/l 26 mmol/l
<b>R 2 enzymes</b>	Cholestérol estérase (CHE) Cholestérol oxydase (CHOD) Peroxydase (POD) 4-Aminophenazone (4-AP)	300 U/l 300 U/l 1250 mmol/l 0.4 mmol/l
<b>Cholestérol calibrant</b>	Cholestérol aqueux standard	200 mg/dl

## ➤ Préparation du réactif de travail (RT)

- Dissoudre le contenu de R2 dans une fiole de R1.
- Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète.

## ➤ Mode opératoire

	<b>Blanc</b>	<b>Standard</b>	<b>Echantillon</b>
<b>RT (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard (µl)</b>	--	10	--
<b>Echantillon (µl)</b>	--	--	10

- Agiter et incuber pendant 5 min à 37°C.
- Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon et du standard à 505 nm contre le blanc.

Calcule 
$$\text{Concentration du cholestérol (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ standard}} \times 200 \text{ (standard conc.)}$$

### 1.1.5. Mesure des triglycérides

➤ *Les réactifs*

<b>R 1 tampon</b>	GOOD pH 7.5 P-chlorophénol	50 mmol/l 2 mmol/l
<b>R 2 enzymes</b>	Lipoprotéine lipase (LPL) Glycérol kinase (GK) Glycérol-3-oxydase (GPO) Peroxydase (POD) 4-Aminophenazone (4-AP) ATP	150000 U/l 500 U/l 2500 U/l 440 U/l 0.1 mmol/l 0.1 mmol/l
<b>Triglycérides calibrant</b>	triglycérides aqueux standard	200 mg/dl

➤ *Préparation du réactif de travail (RT)*

- Dissoudre le contenu de R2 dans une fiole de R1.
- Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète.

➤ *Mode opératoire*

	<b>Blanc</b>	<b>Standard</b>	<b>Echantillon</b>
<b>RT (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard (µl)</b>	--	10	--
<b>Echantillon (µl)</b>	--	--	10

- Agiter bien et incuber pendant 5 min à 37° C.
- Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon et du standard à 505 nm contre le blanc.

Calcule 
$$\text{Concentration des triglycérides (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ standard}} \times 200 \text{ (standard conc.)}$$

### 1.1.6. Mesure de l'aspartate aminotransférase (ASAT / TGO)

➤ *Les réactifs*

<b>R 1 tampon</b>	Tris pH 7.8 L-aspartate	80 mmol/l 200 mmol/l
<b>R 2 substrat</b>	NADH Lactate déshydrogénase (LDH) Malate déshydrogénase (MDH) $\alpha$ -cétoglutarate	0.18 mmol/l 800 U/l 600 U/l 12 mmol/l

➤ *Préparation du réactif de travail (RT)* : Dissoudre un comprimé de R 2 dans une fiole de R 1.

➤ *Mode opératoire*

<b>Réactif de travail (ml)</b>	1.0
<b>Echantillon (<math>\mu</math>l)</b>	100
<b>Température (<math>^{\circ}</math>C)</b>	37

- Mélanger et incuber pendant une minute.
- Lire l'absorbance initiale à 340 nm et démarrer le chronomètre simultanément.
- Lire de nouveau après 1, 2 et 3 minutes.

### 1.1.7. Mesure de l'alanine aminotransférase (ALAT/TGP)

➤ *Les réactifs*

<b>R 1 tampon</b>	Tris pH 7.8 L-alanine	100 mmol/l 500 mmol/l
<b>R 2 substrat</b>	NADH Lactate déshydrogénase (LDH) $\alpha$ -cétoglutarate	0.18 mmol/l 1200 U/l 15 mmol/l

➤ *Préparation du réactif de travail (RT)* : Dissoudre un comprimé de R2 dans le flacon de R1.

➤ *Mode opératoire*

<b>Réactif de travail (ml)</b>	1.0
<b>Echantillon (µl)</b>	100
<b>Température (°C)</b>	37

- Mélanger et incuber pendant une minute.
- Lire l'absorbance initiale à 340 nm et démarrer le chronomètre simultanément.
- Lire de nouveau après 1,2 et 3 minutes.

Calcule

$$ALAT (U/l) = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

1.2. **Bilan de la fonction rénal :**1.2.1. **Dosage de l'urée**➤ *Les réactifs*

<b>R1 tampon</b>	Phosphate pH 6.7 EDTA Salicylate de sodium Nitroprusside de sodium	50 mmol/l 2 mmol/l 400 mmol/l 10 mmol/l
<b>R2 NaClO</b>	Hypochlorite de sodium Hydroxyde de sodium	140 mmol/l 150 mmol/l
<b>R3 Enzymes</b>	Uréase	30000 U/l
<b>Urée calibrant</b>	Urée aqueux standard	50 mg/dl

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

- Dissoudre un comprimé R3 dans la fiole R1, mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète.

- Le réactif R2 est prêt pour l'usage direct.

➤ *Mode opératoire*

	Blanc	Standard	Échantillon
<b>RT (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard (µl)</b>	--	10	--
<b>Échantillon (µl)</b>	--	--	10
Mélanger et incuber pendant 5 min à 37°C			
<b>R2 (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
Mélanger et incuber pendant 5 min à 37°C			

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

Calcul

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

### 1.2.2. Dosage de la créatinine :

➤ *Les réactifs*

<b>R1</b>	Acide picrique	17.5 mmol/l
<b>R2</b>	Hydroxyde de sodium	0.29 mol/l
<b>Créatinine calibrant</b>	Créatinine aqueux standard	2 mg/dl

- *Préparation du réactif de travail (RT) : mélanger à parts égales R 1 et R 2.*

➤ *Mode opératoire :*

	Blanc	Standard	Echantillon
<b>RT (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard (µl)</b>	--	100	--
<b>Echantillon (µl)</b>	--	--	100

- Mélanger et déclencher le chronomètre.
- Lire la densité optique (A1) après 30 secondes à 492 nm et la densité optique (A2) après 90 secondes.
- Calculer :  $\Delta A = \Delta A_2 - \Delta A_1$ . (La concentration du standard = 2 mg/dl).

Calcule

$$\text{Concentration de la créatinine (mg / dl)} = \frac{\Delta A \text{ échantillon} - \Delta A \text{ blanc}}{\Delta A \text{ standard} - \Delta A \text{ blanc}} \times 2$$

**1.3. Dosage du Fer**➤ *Réactifs :*

<b>R1</b>	Guanidine, HCl Tampon acétate pH 5	4,5 mmol/l
<b>R2</b>	Acide ascorbique	40 mmol/l
<b>R3</b>	Ferrozine	1 mg/l
<b>R4</b>	Standard	17,9 µmol/l

➤ *Mode opératoire :*

	<b>Blanc Réactif</b>	<b>Standard</b>	<b>Blanc échantillon</b>	<b>échantillon</b>
<b>Eau distillée (µl)</b>	200	-	-	-
<b>Standard R4 (µl)</b>	-	200	-	-
<b>Echantillon (ml)</b>	-	-	200	200
<b>Réactif A (ml)</b>	-	-	1,0	-
<b>Réactif B (ml)</b>	1,0	1,0	-	1,0

Mélanger attendre 10 minutes puis lire les densités optiques à 562 nm.

➤ *Calcule :*

$$\text{Fer (mg/l)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon}$$

## 2. Fiches techniques Kit DiaMetra (Espagne)

### 2.1 Dosage de LH

Réactif	Calibreur	échantillon/ Contrôle	blanc
échantillon/ Contrôle	20 µL		
Calibreur C0-C5	20 µL		
conjugué	100 µL	100 µL	
Incuber à température ambiante (22 ÷ 28 ° c) pendant 1 heure. Retirer le contenu de chaque puits et laver les puits 3 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée.			
TMB Substrat	100 µL	100 µL	100 µL
Incuber à température ambiante (22 ÷ 28 ° c) pendant 15 minutes dans l'obscurité.			
Solution de Stop	100 µL	100 µL	100 µL
Secouez doucement la microplaque. Lire l'absorbance (E) à 450 nm contre le blanc dans les 5 minutes.			

➤ **Calcul des résultats**

Les concentrations exprimées en mIU/mL.

**Préparation des Solutions pour le Dosage des Parametres du Stress Oxydatif :****1. Dosage du glutathion :*****Solution Tris (0,4 M), EDTA (0,02 M) et pH 9,6 :***

Dissoudre 12,114g Tris et 1,871g EDTA dans 250ml d'eau distillée et ajuster le pH à 9,6 en ajoutant HCL ou NaOH.

***Solution EDTA (0,02 M) :***

Dissoudre 5,613g EDTA dans 750ml d'eau distillée.

***Solution DTNB (0,01 M) :***

Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 ml de méthanol absolu.

***Solution d'acide salicylique (0,25%) :***

Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100ml d'eau distillée.

**2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford :*****Solution BSA (1mg/ml) :***

Dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.

***Réactif de Bradford :***

Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50ml d'éthanol (95%). Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, puis ajouter 100 ml d'acide orthophosphorique (85%) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1L de solution). Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1mois au maximum à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

**2. Dosage du MDA :*****Solution TBS : Tris (50mM), NaCL (150mM) et pH 7,4 :***

Dissoudre 8,775g NaCL dans 1L d'eau distillée, puis poser 6,057g Tris et compléter le volume à 1l par la solution NaCl (150mM) et ajuster le pH à 7,4 en ajoutant HCL ou NaOH.

***Solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%) :***

Dissoudre 20g TCA dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir la solution TCA 20% puis poser 1g de BHT et compléter le volume à 100 ml par la solution TCA 20% et agiter à chaud.

***Solution HCl 0.6 M :***

51,56 ml d'HCl pur et compléter le volume à 1L par l'eau distillée.

***Solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM) :***

Dissoudre 3,149g Tris dans 1L d'eau distillée, puis poser 17,299g TBA et compléter le volume à 1L par la solution Tris (26 mM).

**3. Dosage du glutathion peroxydase (GPx) :*****Solution du GSH (0.1 mM) :***

Dissoudre 3,073 mg GSH dans 100 ml d'eau distillée.

***Solution TCA (1%) :***

Dissoudre 1g TCA dans 100 ml d'eau distillée.

***Solution DTNB (1.0 mM) :***

Dissoudre 100 mg DTNB dans 250 ml de méthanol absolu.

**4. Dosage du Glutathion-S-Transférase (GST) :*****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.