

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun -Tiaret-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière : "Biologie"

Spécialité : "Microbiologie appliquée"

Présenté Par :

- Melle BLIDI Samira
- Melle BENDOUMA Rachida
- Melle BENSEDDIK Wissam

THEME

Evaluation de quelques paramètres oxydatifs tissulaires chez un modèle murin exposé à un polluant environnemental associé à un régime hypergras

Soutenu publiquement le 28 Septembre 2020

JURY :

Grade

Président : Mme BEROUAGUI. S

MAA Faculté des SNV

-Promotrice : Mme BENARABA. R

MCA Faculté des SNV

-Co-promotrice : Mme BOUDALI. S

MAA Faculté des SNV

-Examineur : Mme BENGUIYAR. R

MAA Faculté des SNV

Remerciement

Avant tous, nous remercions ALLAH tout puissant de nous avoir donné le courage, la persistance et permis d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous exprimons les grands remerciements et gratitudes à Mme le docteur **BENARABA RACHIDA**, qui a encadré et dirigé ce travail depuis les premiers instants, nous la remercions pour nous avoir fait l'honneur d'être notre promotrice, pour ses extraordinaires efforts afin de nous aider, de nous conseiller et de nous orienter .sa vision de la recherche scientifique et ses connaissances scientifiques ont largement contribué à l'évolution de cette étude. Nous lui exprimons notre profond respect et nos chaleurs remerciements.

Mes gratitudes vont également à Madame **BOUDALI SOUAD**, Maître assistante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun de Tiaret, qui m'a fait l'honneur de m'avoir enseigné et co-encadré tout le long de ma formation.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Madame **BEROUAGUI. S**, enseignante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun de Tiaret, pour l'attention qu'elle a bien voulu porter à ce travail en acceptant de juger et de présider le jury de la soutenance de ce mémoire. Trouvez ici l'expression de nos sincères remerciements.

Nous remercions s'adresse également à Madame **BENGUIYAR. R** enseignante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun de Tiaret, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant d'examiner ce travail. Trouvez ici l'expression de nos sincères remerciements.

Nous tenons à remercier profondément Madame **FATIHA**, pour son aide son support et ses encouragements. Nous la remercions pour ses bienveillances et ses conseils.

Nos profonds remerciements à Nora et Halima pour l'attention qu'elles ont porté à ce travail, pour leur précieuse aide leurs conseils et surtout leur amitié.

Nos remerciements vont également à tous les enseignants de la faculté de science de la nature et la vie de L'Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

Enfin nous remercions tous ceux qui ont partagés avec nous les moments difficiles de la réalisation de ce modeste travail ceux qui nous ont souhaités bon courage. Nos parents, nos frères et sœurs pour leur soutien indéfectible, mille fois merci de nous encouragé à continuer et à réaliser nos rêves.

Dédicaces

Je le dédie :

A la mémoire de mes grands-parents.

A mes très chers parents, Ahmed et Chettah Fatima

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point vous remercier comme il se doit. Votre affection me couvre, votre bienveillance me guide et votre présence à mes côtés a toujours été la source de force pour affronter les différents obstacles.

A ma chère unique sœur MARWA.

A mes frères : Amine, hadj et Islem.

A ma belle-sœur Khadidja.

A mon neveu le Petit-fils de la famille Ahmed Wassim que j'aime

Qui m'ont soutenue tout au long de ma vie.

A mon trinôme Samira et Rachida. Pour tous les moments qu'on a passés ensemble. A notre belle amitié, nos larmes et nos fous rires, nos déceptions et nos éclats de joie.

A tous mes amies en particulier Yasmine.

A tous mes enseignants chacun par son nom.

BENSEDDIK Wissam.

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail

*A mes chers parents, **Miloud** et **OUGUIBA Kheira** qui m'ont toujours encouragée et conseillée, tous les mots ne puissent exprimer mon amour et mon respect, sans votre présence et votre investissement, je ne serai pas là.*

*A mes chers frères : **Rafik**, **Abd nasseur**, **Hamed Allah**, **Chaker Allah***

*A ma sœur **Sabrina** merci pour ton aide précieuse, votre soutien et vos paroles rassurantes*

*A mon neveu **Massyl** que j'aime*

*A mon amie **Hamida** merci pour nos moments partagés.*

*A mon fiancé **SERRAOUI Bachir** pour m'avoir soutenue, encouragé et supporté durant cette année. Je te remercie infiniment*

*J'adresse ma reconnaissance et mes remerciements les plus profonds et les plus sincères à mes deux chères amies **Wisseem** et **Samira** d'avoir été là, de m'avoir soutenue pendant mes moments de faiblesse.*

BENDOUMA Rchida

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à mes parents Bachir et Adda Fatiha, qui m'ont toujours encouragé et conseillé, tous les mots ne puissent exprimer mon amour et mon respect Que Dieu le Tout Puissant vous procure, santé et longue vie.

À toute ma famille et mes cher Frères (Lakhdar, Mohamed, Saddam et Larbi) qui je vous aime vraiment... Qui ont su m'encourager et me soutenir dans les différentes Situations de ma vie.

À mes belles sœurs Claudia et Sandrine.

À ma chère nièce Amira, À mes chers neveux Abdullah et Bachir que j'aime.

À mes proches Ahmed, Naima et Kheira, pour leur aide et soutien.

À mon trinôme Wissam et Rachida, pour leur conseil et les souvenirs des bons moments passés ensemble, à notre belle amitié, je vous souhaite tout le bonheur et la réussite dans la vie.

À tous mes enseignants chacun par son nom.

BLIDI Samira.

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	I
Liste des annexes.....	II
Liste des figures.....	III
Liste des tableaux	IV
Introduction générale.....	V
Chapitre I : Matériel et Méthodes.....	11
I.1 Objectifs.....	11
I.2 Lieu et durée de travail.....	11
I.3 Matériel et produits chimiques.....	12
I.4 Hébergement, traitement et suivi des animaux.....	13
I.5 Prélèvement et préparation du matériel biologique.....	15
I.5.1 Prélèvement d'organes.....	15
I.5.2 Préparation de l'homogénat d'organe pour la détermination des paramètres oxydants.....	15
I.6 Étude des paramètres oxydatives.....	15
I.6.1 Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissantes avec l'acide thiobarbiturique (TBARS).....	15
I.6.2 Détermination du pouvoir antioxydant total par la technique FRAP « <i>Ferric Reducing Antioxydant Power</i> ».....	16
I.6.3 Oxydation des Protéines dosage des groupements Thiols.....	18
Chapitre II : Résultats et Discussion	
II.1 Impact de l'exposition aux polluants et du régime hypergras sur les paramètres oxydatifs au niveau hépatique.....	20
II.1.1 Evaluation de la peroxydation lipidique.....	20
II.1.2 Evaluation du pouvoir réducteur total.....	22
II.1.3 Evaluation de l'oxydation protéique (groupements thiols)....	22
Conclusion et perspectives.....	27
Références bibliographiques.....	30
Annexe.....	37
Résumé	

Liste des abréviations

AOPP : Produits de protéines d'oxydation avancés

BHT : 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol

BPA : 2,2-bis(4-hydroxyphényl)propane,4,4'-(propan-2-ylidène)diphénol.

DJA : dose journalière admissible.

DT2 : diabète de type 2.

DTNB : 5,5Dithionitrobenzoicacid.

FeCl₃ : Chlorure de fer.

FeSO₄ : sulfate de fer.

FRAP : Ferric reducing antioxidant power.

H₂K O₄P : phosphate de potassium monobasique.

HCl : chlorure d'hydrogène

HCTT116 : *cellules tumorale humaine du colon.*

HG : *Hypergras.*

K₂HPO₄ : *phosphate de potassium dibasique tri hydrate.*

MDA : *Malondialdéhydes.*

NAC : *N-acetyl-L cystéine.*

NaCl : *Chlorure de sodium.*

PE : *perturbateur endocrinien*

PEE : *perturbateurs endocriniens environnemental.*

ST : *régime standard.*

TBA : *Acide thiobarbiturique.*

TBARS : *Thiobarbiturique Acide Réactive Substance.*

TCA : *Acide Trichloracétique*

Liste des abréviations

TEB : Tébuconazole .

TEP : 1,1,3,3 tétraéthoxypropane.

TPTZ : Tripyridyl-s-Triazyne.

Liste des annexes

Annexe I : Courbe de la gamme d'étalonnage du TEP pour l'évaluation de la peroxydation lipidique.

Annexe II : Courbe de la gamme d'étalonnage du FeSO_4 pour l'évaluation du pouvoir réducteur.

Annexe III : Courbe de la gamme d'étalonnage de la N-Acétyl-Cystéine pour l'évaluation des taux des protéines à groupement SH.

Annexe IV : préparation des tampons.

Annexe V : Matériels expérimentale.

Annexe VI : Préparation de l'homogénat.

Annexe VII : Les étapes de test TBRS.

Annexe VIII : Résultats des tests.

Annexe IX : polluant environnementaux utilisés.

Annexe X : fiche toxicologique de tébuconazole

Annexe XI : fiche toxicologique de Bisphénol A

Liste des figures

Figure n°01 : Diagramme récapitulatif de la démarche expérimentale.....	14
Figure n°02 : Mécanisme réactionnel entre les (ERO) et les lipides membranaires	16
Figure n°03 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH).....	17
Figure n°04 : Mécanisme réactionnel entre le DTNB et un groupement thiol (SH).....	18
Figure n°05 : Effet de l'exposition aux polluants et des régimes expérimentaux sur la peroxydation lipidique (MDA en $\mu\text{mol/g}$ de tissu)	20
Figure n°06 : Effet de l'exposition aux polluants et des régimes expérimentaux sur le pouvoir réducteur hépatique (FRAP $\mu\text{mol/g}$ de tissu).	22
Figure n°07 : Effet de l'exposition aux polluants et des régimes expérimentaux sur les marqueurs oxydatifs protéiques (groupement SH $\mu\text{mol/g}$ de tissu).....	23

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Matériel, réactifs et produits chimiques utilisés.....	12
---	-----------

Introduction générale

Introduction

Aujourd'hui l'Algérie est classée dans la catégorie des pays ayant un niveau de développement humain élevé, ce qui l'a obligée à accroître les investissements dans le secteur agricole en jouant sur l'augmentation des surfaces cultivées et en garantissant un fort rendement des récoltes, ce genre de politique a été mise en place afin d'améliorer la sécurité et autosuffisance alimentaire nationale (**Bessaoud et al.,2019**). Cependant cette stratégie incite à l'utilisation intensive de pesticides, ces produits sont destinés à repousser ou détruire les nuisibles, (champignons, animaux ou végétaux), durant la production, le stockage ou la commercialisation de produits agricoles. L'utilisation de ces pesticides permet de proposer des produits végétaux d'aspect irréprochables. Outre leur popularité dans le domaine agricole et leur utilisation massive, les pesticides, restent avant tout des produits nocifs et il est important de souligner que le consommateur s'intéresse désormais à un aliment sain garantissant une bonne santé pour l'organisme et vanté pour ses qualités nutritionnelles que pour son goût et son aspect. Parmi les 800 pesticides utilisés dans le monde la plupart d'entre eux sont suspectés de participer à l'émergence des maladies métaboliques par leur action en tant que perturbateurs endocriniens (**Girard et al.,2019**). Ces derniers sont des substances chimiques d'origine naturelle ou de synthèse, étrangère à l'organisme, capable d'interférer avec le fonctionnement du système endocrinien en se liant de manière illicite aux récepteurs normalement occupés par les hormones naturelles (**chevalier,2016**), ils peuvent interagir avec les gonades, la thyroïde et les surrénales, mais aussi avec le système nerveux central, lymphoïde, le tube digestif et le système cardiovasculaire. Ils entraînent à long terme, sur l'individu et/ou sa descendance, l'apparition des pathologies du développement, de la reproduction, et des cancers hormono-dépendants (**Desbiolles et Gaillot,2019**). Ces substances sont ubiquitaires dans notre quotidien. Le plus connu est le bisphénol-A, parabènes, phtalates et certains pesticides. Déjà accusés de jouer un rôle dans la baisse de la fertilité masculine et l'évolution fœtale, les perturbateurs endocriniens sont soupçonnés aussi d'avoir un effet nocif dans la survenue de l'obésité et du diabète de type 2 (**Schlienger ,2014**). En effet l'étiologie exacte de ces pathologies reste méconnue et les facteurs de risque classiques que sont l'augmentation des apports caloriques, la sédentarité et le régime alimentaire déséquilibré (régime hypercalorique) n'expliquent pas à eux seuls l'importance et la rapidité de la progression de leur prévalence et leur extension géographique actuelle. C'est pour cette raison qu'on incrimine d'autres facteurs, essentiellement environnementaux, dans la survenue de ces épidémies et leurs complications. Au banc des accusés, figurent les perturbateurs endocriniens et certains pesticides. Ces substances sont capables d'affecter l'homéostasie en matière de poids et perturbent les mécanismes de contrôle de l'adipogenèse

Introduction

et de la balance énergétique (Chevalier et al., 2017). En outre, ils pourraient aussi causer la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans de nombreux organismes, organes, tissus, d'où l'installation d'un stress oxydatif, un phénomène fortement impliqué dans le développement des maladies chroniques parfois mortelles, tels que les cancers. Plusieurs études au niveau international ont mis en évidence les propriétés dangereuses des substances actives des pesticides sur la santé et l'environnement à forte dose (BALDI et al., 2013) mais il semblerait que même les faibles doses sensées être sans effets nuisibles sur la santé humaine ont un effet néfaste à long terme. Dans ce contexte le présent travail consiste à étudier l'impact d'une interaction régime hypercalorique et tébuconazole, un fongicide systémique de la famille des triazoles connu pour sa persistance dans l'environnement chez des jeunes rats femelles. Cette étude s'est particulièrement intéressée à la survenu d'une altération oxydative au niveau tissulaire due à l'exposition chronique et à faible dose, de l'ordre de la DJA, de ce fongicide associé ou non à un régime hypercalorique, la toxicité et le mode d'action du Tébuconazole ont été appréciés en les comparant à ceux du BPA, un perturbateur endocrinien incontestable et le plus répandu dans l'alimentation humaine.

Partie expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

I.1 Objectifs

I.1.1 Objectif principal

Ce présent travail s'intéresse à étudier le lien entre le survenu d'une altération oxydative au niveau tissulaire et l'exposition chronique et à des faibles doses, de l'ordre de DJA, de deux polluants environnementaux : le bisphénol A et le tébuconazole, seuls ou associés à un régime riche en graisse.

I.1.2 Objectifs secondaires

- Evaluer l'impact d'une exposition chronique, du rat Wistar, à deux polluants environnementaux (Bisphénol A et Tébuconazole), à de faibles doses correspondant aux doses journalières tolérables définies chez l'homme.
- Déterminer le mode d'action de la toxicité du Tébuconazole à faible dose, en le comparant à celui de BPA, un perturbateur endocrinien incontestable et le plus répandu dans l'alimentation humaine, et ce dans les mêmes conditions expérimentales.
- Etudier l'effet d'une interaction entre perturbateurs endocriniens /régime hyper gras sur les paramètres oxydatifs.

I.2 Lieux et la durée de travail

La démarche expérimentale relative à cette présente étude a été réalisée sur une période allant du 04 Janvier 2020 au 14 Mars 2020, elle a été effectuée au sein des laboratoires de recherche d'Amélioration et Valorisation des Productions Animales Locales (LAVPAL) de l'université Ibn Khaldoun –Tiaret.

Matériel et Méthodes

I.3 Matériel et produits chimiques

Le matériel et les produits chimiques nécessaires à l'accomplissement de ce travail sont cités dans le tableau ci-après

Tableau n°01 : Matériel, réactifs et produits chimiques utilisés

Matériel	Produits chimique et réactifs
-Agitateur magnétique	- Acétate de sodium ($C_2H_3NaO_2$) $PM=82,03g/mol$, sigma.
-Bain marie (GFL)	- Acide acétique glacial (CH_3COOH) $PM=60,64g/mol$, sigma.
-Balance analytique (DHAUS POINNEER)	- Acide thiobarbiturique (TBA) $PM=144,2g/mol$, sigma. - Acide trichloracétique (TCA) CCl_3COOH $PM=163,39g/mol$, sigma.
-Vortex (TECHNOKARTELL)	- Butanol-1 $C_4H_{10}O$ $PM=74,12g/mol$, sigma. - Chlorure de fer $FeCl_3$ $PM=162,20g/mol$, sigma.
-Centrifugeuse (SIGMA)	- Chlorure d'hydrogène HCL à 36% $PM=36,46g/mol$, sigma. - N-acetyl- L cystéine (NAC) $C_5H_9NO_3$ $PM=163,2g/mol$, sigma.
-Chronomètre (HUNGHANS)	- Phosphate de potassium monobasique H_2KO_4P $PM=136,09g/mol$, sigma.
-Micropipette (ACUMMAX)	- Phosphate de potassium dibasique tri hydrate $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ $PM=228,23 g/mol$, sigma.
-pH mètre (OHAUS)	- Sulfate de fer ($FeSO_4$) $PM=278,01g/mol$, sigma. - Tripyridyl-s-Triazyne C_8H_{10} (TPTZ) $PM=312,33g/mol$, sigma
-Spectrophotomètre UV-Vis (OPTIZEN 1412 V)	- 5'5-dithio-bis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB), $PM=396.34 g/mol$, sigma.
-Broyeur (ultraturax)	- Sodium Dédocyl Sulfate (SDS), $PM=288,379g/mol$, sigma

I.4 Hébergement, traitement et suivi des animaux :

Notre expérimentation a été réalisée dans le but d'évaluer le statut oxydatif au niveau hépatique chez des jeunes rats femelles de souche *Wistar* nourris avec un régime standard ou un régime hypergras et exposés pendant 16 semaines à deux polluants environnementaux soit le bisphénol A ou le tébuconazole à une dose de 50µg/kg/j et de 30µg/kg/j respectivement. Cette exposition a concerné la voie orale via l'eau de boisson fournie dans des biberons composés d'une bouteille en polypropylène et d'une tétine en inox inoxydable. 6 lots de rats ont été constitués et soumis aux conditions ci-dessous

-Les animaux de premier lot (s) ont reçu un régime standard à base d'amidon (42 ,12%) et une eau de boisson standard.

- Le second lot (HG) a été soumis à un régime Hyper Gras (HG) enrichi en graisse animale ovine (48%) et a reçu une eau de boisson standard.

- Le troisième lot (HG+BPA) a été soumis à un régime Hyper Gras (HG) et exposé au Bisphénol A (BPA à 50 µg/kg/j) via l'eau de boisson.

- le quatrième lot (S+BPA) a été soumis à un régime standard et a été exposé au bisphénol A (BPA à 50µg/kg/j).

- le cinquième lot (HG+TEB) a été soumis à un régime Hyper Gras (HG) et a été exposé au Tébuconazole (TEB à 30 µg/kg/j).

- le sixième lot (S+TEB) a reçu à un régime standard (S) et a été exposé au Tébuconazole (TEB à 30 µg/ kg/j).

Toutes les procédures d'hébergement, traitement, suivi, sacrifice des rats et le prélèvement d'organe ont été réalisées par une autre équipe durant la période allant du 30 décembre 2018 au 12juin 2019.

Matériel et Méthodes

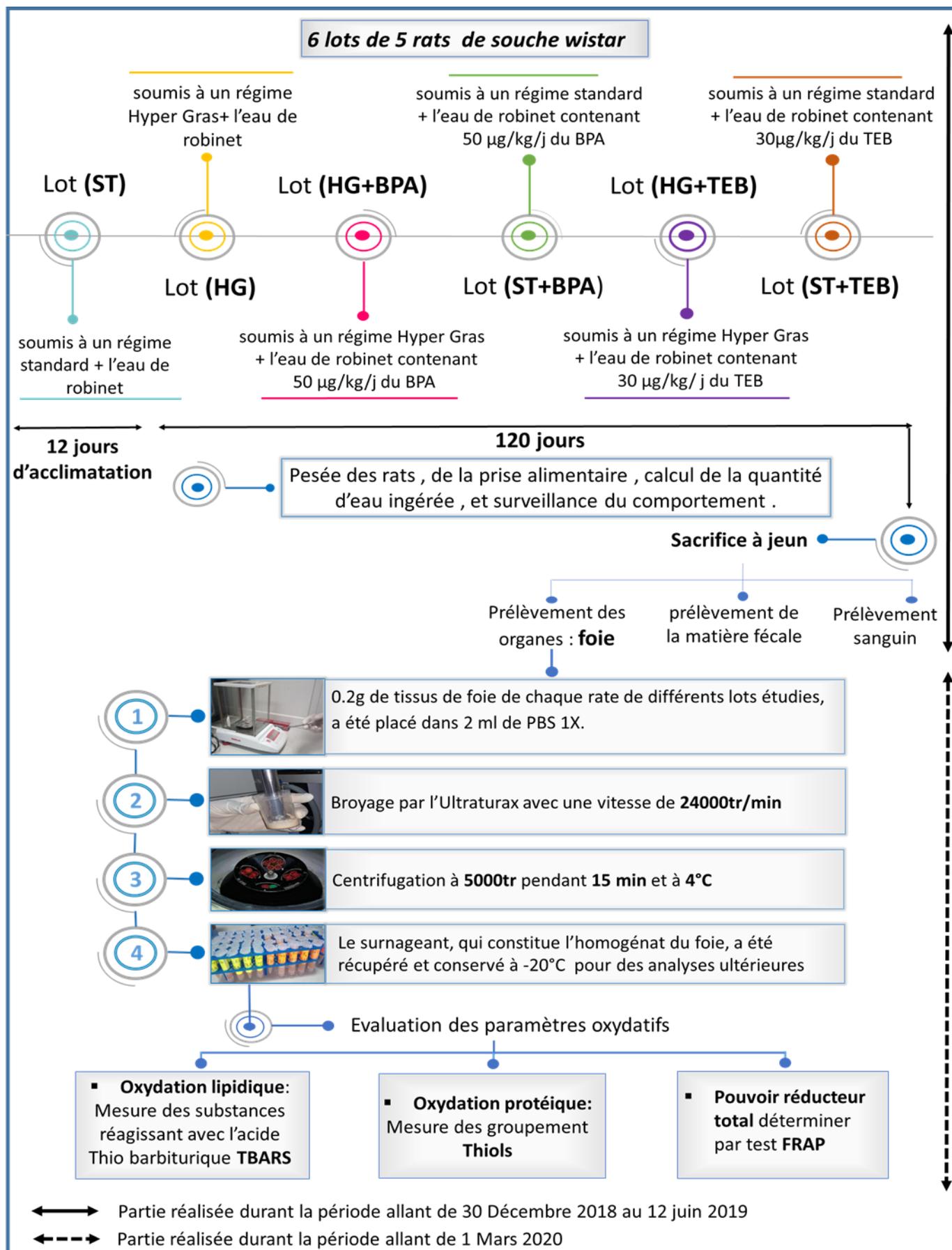


Figure n°01 : Diagramme récapitulatif de la démarche expérimentale

I.5 Prélèvement et préparation du matériel biologique :

I.5.1 Prélèvement d'organe :

Après le prélèvement sanguin, le foie a été soigneusement prélevé, rincé avec du NaCl à 0.9% et conservés à -20°C (cette étape a été réalisée par l'équipe de l'année passée 2018/2019), et cette année nous sommes concernés par l'évaluation des différents paramètres oxydatifs du foie.

I.5.2 Préparation de l'homogénat du foie pour la détermination des paramètres du stress oxydant

0.2g d'organe (le foie), a été placé dans 2 ml de PBS 1X (la composition et la préparation du tampon PBS sont décrites dans l'annexe n°IV), puis broyer à l'Ultra-TURRAX avec une vitesse de (24000tr/min). L'ensemble a été centrifugé à 5000tr pendant 15 min et à 4°C. Le surnageant, qui constitue l'homogénat d'organe, a été récupéré et conservé à -20°C.

I.6 Etude des paramètres oxydatifs

I.6.1 Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissantes avec l'acide thiobarbiturique (TBARS)

✓ Principe

La quantité des TBARS est exprimée en terme d'un équivalent biochimique qui est le Malonyl di aldéhyde « MDA », un des produits terminaux formés lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés. Les malondialdéhydes (MDA), produits issus de la peroxydation lipidique, sont considérés comme les marqueurs du stress oxydant les plus utilisés à ce jour (Favier, 1997).

L'évaluation des teneurs en MDA repose sur une méthode de dosage indirecte de l'impact des radicaux libres. Elle mesure les substances issues de la lipopéroxydation réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBA). La réaction de dosage, décrite par Kohn et Liversedge en 1951, précisée par Patton et Kuntz en 1951, repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment absorbant à 532 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol (Voir figure n°02). La réaction colorée, observée avec l'acide thiobarbiturique, mesure non seulement le malondialdéhyde préexistant, mais aussi le malondialdéhyde formé de

manière artefactuelle par décomposition thermique des peroxydes, et de ceux générés au cours même de la réaction. Les méthodes utilisées actuellement dérivent de celle de (Yagi ,1976).

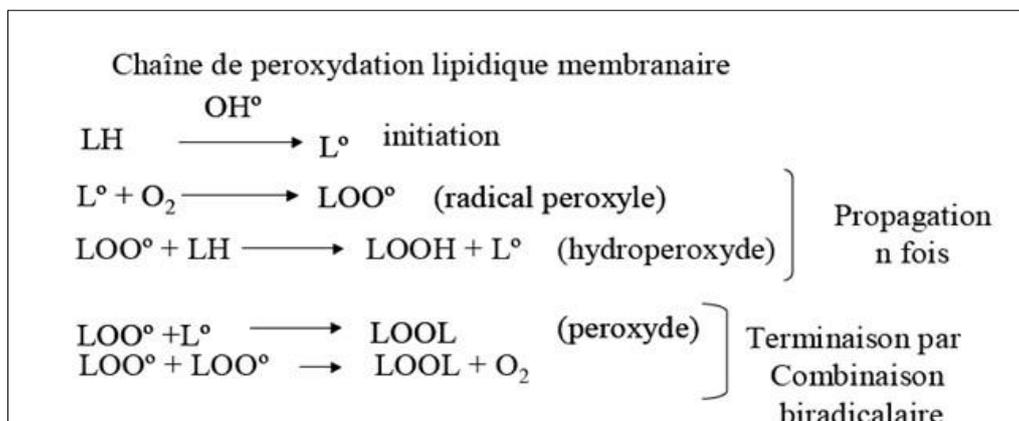


Figure n°02 : Mécanisme réactionnel entre les (ERO) et les lipides membranaires

-Mode opératoire

Cette analyse a été réalisée sur homogénats tissulaire, pour ce faire, 800 µl d'un mélange réactionnel constitué d'acide thiobarbiturique (TBA à 0,375 %) d'acide trichloracétique (TCA à 20%), 2,6-di-tert-butyl-4- méthylphénol (BHT à 0.01%) et chlorure d'hydrogène (HCl à 1N) sont ajoutés à 200 µl d'échantillon. Après agitation de 2 min, le mélange est incubé au bain marie à 100°C pendant 15 minutes. Durant cette étape, les fonctions aldéhydiques du dialdéhyde malonique (MDA) sont libérées par l'hydrolyse acide à 100°C. Elles réagissent avec le TBA en formant un complexe coloré en rose (MDA-TBA). Pour arrêter la réaction, les tubes sont placés dans la glace, le complexe ainsi formé est extrait par le butanol-1 et centrifuger à 4000 tr/min pendant 10 min à 4°C.

Après centrifugation, la quantification du complexe a été effectuée sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 532nm. La concentration en MDA tissulaire a été calculée en utilisant une courbe d'étalon de 1, 1, 3,3-Tétra Ethoxy Propane (MDA) (la courbe de la gemme d'étalonnage figure dans l'annexe I).

I.6.2 Détermination du pouvoir antioxydant total par la technique FRAP «

***Ferric Reducing Antioxydant Power* »**

✓ **Principe**

La méthode FRAP développée par Benzie et Strain (1996) est basée sur la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III) -TPTZ)2] en un complexe tripyridyltriazine ferreux [(Fe(II)-TPTZ)2] par un antioxydant (AH), à un pH de 3,6 pour maintenir la solubilité

du fer (Voir figure n° 03). Lors de la réduction du complexe ferrique en complexe ferreux une coloration bleu intense apparaît très rapidement avec un maximum d'absorption à 593 nm. Le pouvoir réducteur est proportionnel à la formation de la couleur bleue, plus la couleur bleu est intense, plus l'échantillon peut être considéré comme un bon réducteur.

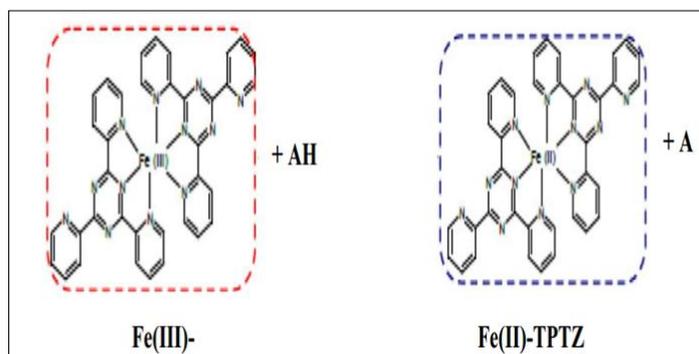


Figure n° 03 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH)

- Mode opératoire

Ce test peut être utilisé comme un index du pouvoir antioxydant des défenses non enzymatiques. Il est basé sur la mesure de la réduction par le plasma ou l'homogénat tissulaire dans des conditions d'acidité (pH 3,6), d'une solution comprenant du tampon acétate, une solution à base de 2, 4,6 Tripyridyl -s-triazine (TPTZ), et un sel ferrique (FeCl_3), ce qui provoque la formation du complexe TPTZ- Fe^{++} de couleur bleu. Une gamme étalon est obtenue à partir d'une solution mère de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 100 mM (la courbe de la gamme d'étalonnage figure dans l'annexe II).

La solution FRAP est préparée à partir des trois solutions initiales : tampon acétate ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ et $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) à pH 3,6, TPTZ à 8 mM et $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 20mM) et placée à 37°C pendant toute la durée de l'analyse. 100 μl d'échantillon dilué ou de la solution de la gamme ont été ajoutés à 900 μl de la solution FRAP. La lecture des échantillons a été réalisée après 30 minutes d'incubation par spectrométrie à 593 nm.

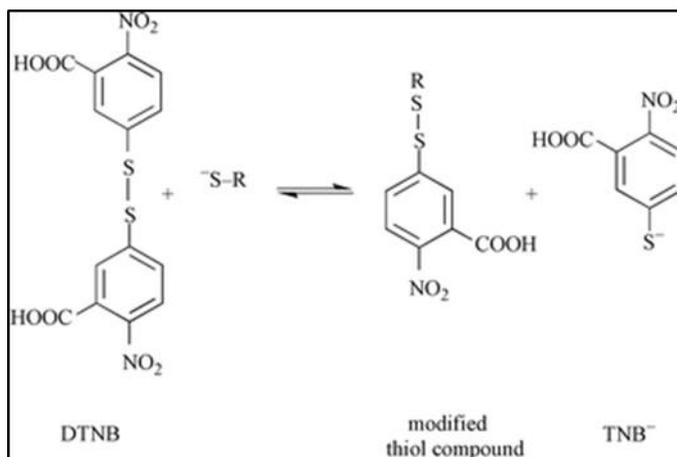


Figure n°04 : Mécanisme réactionnel entre le DTNB et un groupement thiol (SH).

I.6.3 Oxydation des Protéines dosage des groupements Thiols (Faure et Lafond.,1995)

- Principe

Lors de l'oxydation des protéines, les groupements SH sont oxydés et forment des ponts disulfures S-S. C'est une méthode colorimétrique qui repose sur les propriétés réductrices des groupements thiols (SH). En présence des groupements thiols de l'échantillon, le pont disulfure (S-S) contenu dans le réactif d'Ellman ou DTNB (5-5' dithionitro benzoic acid) va être réduit et donner des dérivés thiols aromatiques [RNB (acide 5-thio (2-nitrobenzoïque))] colorés et possédant une absorbance 412 nm. La vitesse de la réaction sera différente selon que le DTNB se trouve en présence de SH protéiques ou non protéiques.

Cette différence peut, dans certaines conditions de pH et de forme ionique, être accentuée et permettre ainsi la mesure des SH protéiques et celle des SH totaux. Les groupements thiols protéiques sont très sensibles à l'oxydation, y compris par l'oxygène moléculaire. Il convient de manipuler rapidement les échantillons à 4°C, d'utiliser des centrifugeuses réfrigérées. Il est possible de conserver les échantillons à - 20°C.

-Mode opératoire

375 µl de tampon phosphate à 0,05 M ont été ajoutés à 250 µl de l'échantillon ou du point de gamme (préparée à partir d'une solution de N-Acetyl-Cystéine (NAC à 1 mM), ou l'échantillon, après une légère agitation 125 µl du réactif d'ELLMAN ont été ajoutés, le mélange ainsi obtenu a été agité à l'aide d'un vortex et incubé pendant 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture de l'absorbance a été effectuée à une longueur d'onde de 412 nm.

Chapitre II

Résultats et discussion

II.1 Impact de l'exposition aux polluants et du régime hypergras sur les paramètres oxydatifs au niveau hépatique

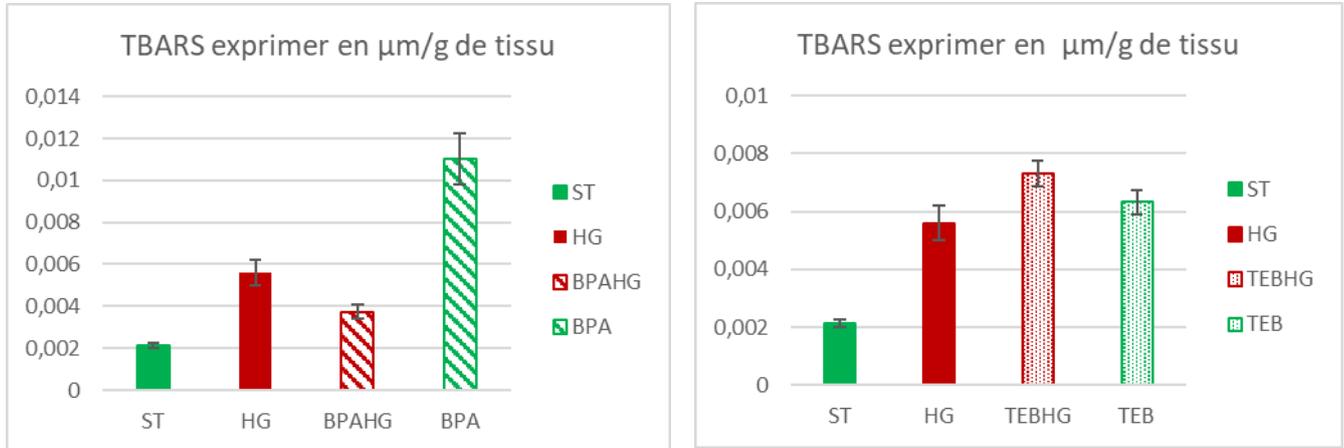


Figure n° 05 : Effet de l'exposition aux polluants et des régimes expérimentaux sur la peroxydation lipidique (MDA en $\mu\text{mol/g}$ de tissu).

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes \pm SEM avec $n=5$

(A) : groupes Bisphénol A ; (B) : groupes Tebuconazole.

II.1.1 Evaluation de la peroxydation lipidique :

Cette étude s'intéresse à un modèle murin d'exposition chronique à deux polluants (le Tebuconazole et le Bisphénol A) via leur ajout à une alimentation obésogène (régime hypergras) ou standard. Les doses des polluants sont ajustées de sorte à ce que l'exposition soit de l'ordre de la DJA (Dose Journalière Tolérable), supposée sans effet chez l'homme, pour chacun des 2 polluants.

Nos résultats montrent que dans un contexte d'obésité induite par un régime, l'exposition au Tebuconazole (TEB) et le Bisphénol A (BPA) altère le statut oxydatif hépatique des rats femelles exposés pendant 16 semaines via leur alimentation. En effet, les résultats de l'oxydation lipidique au niveau hépatique, évaluée par la technique TBARS, illustrés dans la figure n°05, révèlent que le groupe des rats femelles soumis au régime hypergras (HG) possède un taux supérieur des MDA, indice de la peroxydation lipidique, en comparaison avec le groupe des rats sous régime standard (ST). On note (0,0056 *versus* 0,00214). D'autre part, une hausse des taux des lipides oxydés très importante est constatée au niveau hépatique chez les groupes de rats femelles sous régime HG associé aux TEB (30,35 %) ainsi que les

groupes exposés uniquement au BPA ou le TEB et ce avec des taux de 29 % et de 12,85 % respectivement, et en opposant l'ensemble de ces groupes au groupe HG (voir figure n°05). Toutefois, ce dernier présente un taux en MDA hépatiques, évalué à 33,21% est supérieur à celui du groupe des rats femelles sous régime HG associé au BPA (BPAHG). Alors que les résultats des taux des MDA hépatiques au sein du groupe ST se révèlent très inférieur en comparaison avec le groupe HG.

Aussi, nos résultats montrent de manière intéressante une différence entre les deux groupes TEB et le groupe de rats sous régime HG et exposé au TEB (TEBHG). On distingue des taux d'augmentation des MAD dans le foie différent entre ces deux groupes, ces derniers sont de l'ordre de 12,85% pour le groupe TEB et de 30,35% pour le groupe TEBHG. Ces taux d'augmentation sont évalués par rapport aux teneurs en MDA des rats femelles soumis au régime HG. Il semblerait que l'effet du TEB sur l'oxydation lipidique est plus important chez le groupe HG par rapport au groupe des rats exposés au TEB. Inversement, une augmentation plus accentuée des taux des MDA chez le groupe BPA est remarquée en comparaison avec celle du groupe des rats femelles sous régime BPAHG. Il est fort probable que l'accumulation du BPA dans le tissu adipeux des rats femelles réduit sa biodisponibilité pour les autres organes, ce qui limite en conséquence, son effet oxydant sur les lipides.

II.1.2 Evaluation du pouvoir réducteur total :

Les résultats du pouvoir réducteur hépatique sont représentés dans la figure n°06, cette dernière montre que le régime HG ainsi que les polluants influencent de manière remarquable le pouvoir réducteur évalué par la technique FRAP. En effet le taux de diminution du pouvoir réducteur hépatique chez les groupes TEBHG et TEB est évalué à 47,72 % et 24,47 % respectivement, alors qu'une augmentation de 40,23% du pouvoir réducteur du groupe BPA a été observée et ce par rapport au groupe HG. Néanmoins le pouvoir réducteur des rats exposés au BPA et associé au régime HG reste inférieur à celui des rats témoins. Les rats du groupe ST présentent un pouvoir réducteur plus élevé en le comparant au groupe HG (19,079 vs 13,319). De manière similaire aux résultats d'évaluation de la peroxydation lipidique, on distingue un pouvoir réducteur altéré et différent entre les groupes TEB et TEBHG. L'exposition simultanée aux TEB et au régime HG réduit le pouvoir réducteur au niveau hépatique de manière accentuée en comparaison avec le traitement au TEB ceci est reflété par les taux du FRAP constaté chez les deux groupes de rats TEBHG et TEB (47.72 % vs 24,45 %). Il va de même pour les groupes _BPA, BPAHG (40,23 % vs 0,68 %).

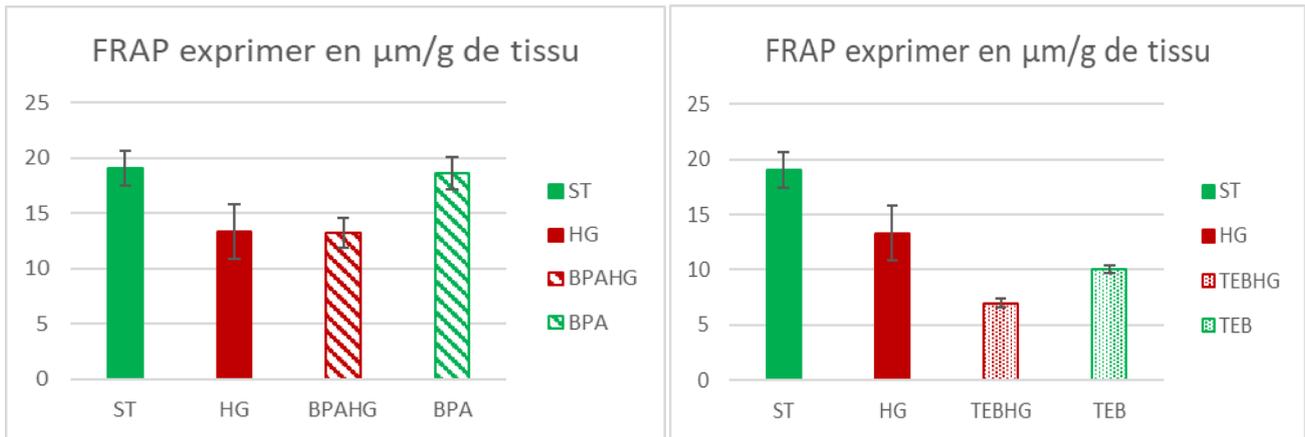


Figure n° 06 : Effet de l'exposition aux polluants et des régimes expérimentaux sur le pouvoir reducteur hépatique (FRAP µmol/g de tissu).

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes ± SEM avec n=5

(A) : groupes Bisphénol A ; (B) : groupes Tébuconazole

II.1.3 Evaluation de l'oxydation protéique (groupements thiols) :

Le traitement des rats par le BPA et le TEB pendant 16 mois engendre une altération oxydative des protéines, les teneurs hépatiques en protéines aux groupements thiols (groupements SH) varient entre les différents lots de rats. Comparés aux rats du groupe HG, les résultats révèlent que les teneurs des protéines aux groupements SH chez les groupes BPAHG, BPA, TEBHG, TEB sont inférieures à celles du groupe HG. Ces groupes présentent et dans l'ordre les taux de diminution suivants : (5,39 % ; 7,55 % ; 25,21 % ; 10,33 %)

De manière similaire le régime hypergras provoque une altération oxydative des protéines hépatiques, le dosage des groupements SH chez les rats nourris par ce régime présente une réduction du taux des protéines aux groupements SH chez le groupe des rats femelles nourris par le régime (ST) cette diminution est estimée à (22,25 *versus* 23,85).

De même, les concentrations des protéines à groupement SH des rats femelles sous régime HG et exposés au TEB sont inférieures à celles constatées chez le groupe des rats exposés uniquement aux TEB, ce dernier associé au régime HG exacerbe l'oxydation protéique. Cependant l'effet adverse est observé lors du traitement par BPA, les taux des protéines oxydées chez le groupe des rats femelles traités au BPA sont supérieures à ceux du groupe BPAHG.

Résultats et Discussion

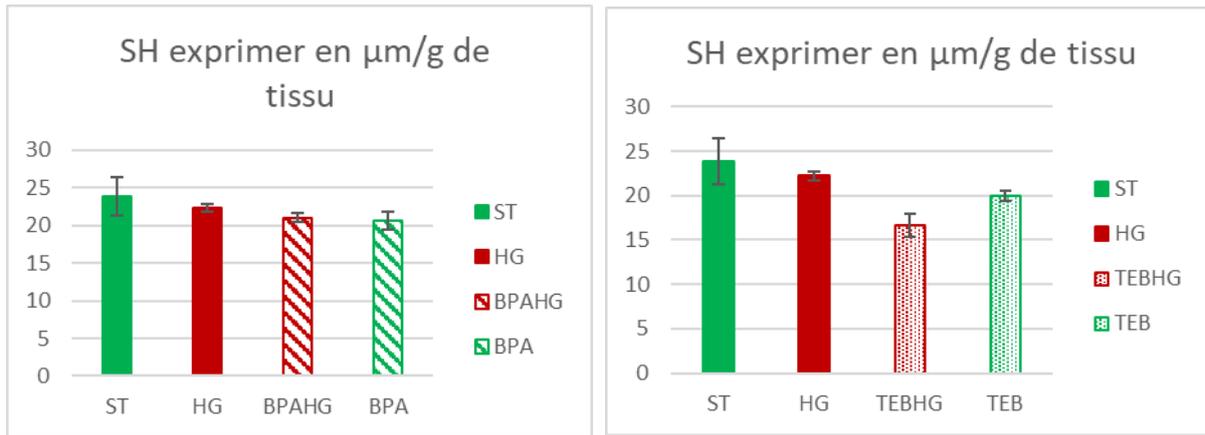


Figure n° 07 : Effet de l'exposition aux polluants et des régimes expérimentaux sur les marqueurs oxydatifs protéiques (groupement SH $\mu\text{mol/g}$ de tissu)

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes \pm SEM avec $n=5$

(A) : groupes Bisphénol A ; (B) : groupes Tébuconazole

(5,39 % vs 7,55 %). Ceci va de pair avec les résultats de la peroxydation lipidique au niveau hépatique présentés ultérieurement, cette constatation peut être expliquée par le caractère lipophile du BPA ce qui lui permet de s'accumuler au niveau du tissu adipeux en réduisant ainsi sa disponibilité pour les autres tissus. En effet, de nombreux polluants lipophiles sont stockés principalement dans le tissu adipeux et ce dernier peut être vu à la fois comme une « éponge » avec un rôle protecteur contre la circulation de ces composés mais aussi comme un réservoir pouvant décharger et de manière régulière et en faibles quantités ces molécules (Ambolet-Camoit *et al.*,2012). A long terme et après relargage de ces substances, le tissu adipeux se comportant comme une source d'exposition interne (Schlienger.,2014).

Les résultats de l'évaluation des paramètres oxydatifs issus de notre étude indiquent clairement que le régime hypergras génère un stress oxydant au niveau hépatique chez les rats femelles utilisés dans cette expérimentation. Ce dernier est reflété par une augmentation des taux des MDA, des teneurs des protéines oxydées et par une diminution du pouvoir réducteur total. Il semblerait que, le régime HG incite la production abusive des espèces réactifs de l'oxygène au niveau hépatique ce qui mène à l'amoindrissement de l'aptitude de défense antioxydante. En effet, il a été largement décrit que l'altération de la balance oxydant/antioxydant par les régimes obésogènes et hypercaloriques, tels que le régime cafeteria et le régime hyperlipidique, provoque des dommages cellulaires, se traduisant par

une augmentation de la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines et les dommages à l'ADN, l'ensemble de ces altérations conduit à l'induction d'un stress oxydant systémique (**Vincent et Taylor, 2006 ; Savini et al., 2013 ; DeMarchi et al., 2013 ; Bonnefont-Rousselot, 2013; Luo et al., 2015; Marseglia et al., 2015**). Les altérations oxydatives irréversibles des macromolécules (lipides, protéines et acides nucléiques), dues à la production continue et élevée des ERO, peuvent conduire à un dysfonctionnement endothélial et des processus inflammatoires et l'induction d'un désordre métabolique associé à l'obésité et ses complications (**Bonnefont,2013 ; Baudin,2020**). Parallèlement et comme indiqué précédemment , administrés à des DJA, le BPA et le TEB accentuent le déséquilibre de la balance oxydant /antioxydant induit par le régime HG, ceci est reflété par l'augmentation des taux des MDA, l'altération du pouvoir réducteur et de l'induction des protéines oxydées, aussi le polluant (le BPA ou le TEB) à lui seul ,sans association au régime HG, induit un impact négatif sur les paramètres oxydatifs mais le degré de l'impact diffère entre les deux polluants et selon le contexte alimentaire (régime standard ou bien hypergras).

Des études récentes ont démontré que l'exposition orale au BPA à différentes doses diminuait les activités enzymatiques de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT), et les taux du glutathion réduit (GSH) chez différents modèles expérimentaux, il est démontré qu'il est aussi capable d'induire une augmentation des taux des malondialdéhydes un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiés par les radicaux libres (**Halliwell et al.,1992 ; Hassen et al.,2012 ; Kamel et al., 2018 ;poormoosavi et al., 2018 ; Acaroz et al., 2019**) .

Hassan et al., (2012), établissent qu'une exposition croissante au BPA sera à l'origine d'une hépatotoxicité ainsi qu'une diminution des teneurs en GSH, en SOD et en glutathion peroxydase (GPX). Aussi, il est démontré qu'une administration croissante du BPA par voie orale altère la fonction rénale par néphrotoxicité et diminue la teneur en GSH (**Kobroob et al.,2018**).

Au cours de cette présente étude et suite au traitement des rats au TEB, une augmentation des taux des MDA et des taux des protéines oxydées sont constatés également. Plusieurs études suggèrent que ce pesticide est capable d'induire une peroxydation lipidique en perturbant ainsi la fluidité et l'excitabilité des membranes cellulaires traduite par la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial (**Benothmène et al.,2018**). Mais aussi l'inactivation de récepteurs ou d'enzymes (**Michel et al.,2008**). De même, le TEB s'est montré capable d'augmenter l'activité des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), il provoque une oxydation protéique, ces résultats

corroborent celui de Bensaad et son équipe, celui-ci indique une augmentation des taux de l'AOPP (Produits de protéines d'oxydation avancés), un autre marqueur du stress oxydatif et de l'oxydation protéique, suite à une exposition des rats au TEB confirmant ainsi l'oxydation des protéines par les radicaux libres générés suite au traitement par ce polluant (**Bensaad *et al.*,2017**).

Par ailleurs une étude menée sur une culture des cellules HCTT116 (cellules tumorales humaines du colon), traitées au TEB signale que l'exposition de ces cellules tumorales à ce fongicide entraîne une nette augmentation du taux des radicaux libres. Ces derniers sont capables d'interagir avec la bicouche lipidique et provoquer ainsi la lipoperoxydes révélée par une importante augmentation des concentrations de malondialdéhyde (MDA). Une augmentation importante de l'activité des enzymes antioxydantes particulièrement la SOD et la CAT, a été décelée en réponse au stress exacerbé et généré par le TEB. Cette étude indique clairement que le stress oxydatif est fortement impliqué dans le mécanisme de la toxicité du TEB. (**Benothmène *et al.*,2018**).

Tous ces complications oxydatives hépatiques observés avec le traitement du TEB et BPA corroborent ceux indiqués dans une étude récemment publiée, celle-ci explique que l'exposition alimentaire des souris femelles à un mélange de 6 pesticides, perturbateurs endocroniens, à des doses non toxiques (DJA) pendant une année, induit des perturbations oxydatives hépatiques. Ainsi, il a été démontré que l'exposition à de faibles doses de BPA altèrent le métabolisme des lipides contribuant au développement de la stéatose hépatique. (**Marmugi *et al.*,2012 ; Chevalier, 2017**).

Selon plusieurs auteurs, la toxicité engendrée par ce pesticide s'exerce notamment via sa biotransformation dans le foie par les mono-oxygénases à cytochrome P450 en des dérivés hautement réactifs (ERO) causant un stress oxydant (**Chevalier, 2017**). Le désordre métabolique qui en résulte, peut induire des modifications des voies de signalisation qui contrôlent la prolifération et la survie cellulaire, une réponse inflammatoire, des dommages à l'ADN et exercer des impacts sur l'activité mitochondriale, ce qui peut conduire à une perturbation de la balance oxydative (**Gamet-Payraastre et Lukowicz, 2017**). Ces lésions seront observées majoritairement au niveau hépatique, siège du métabolisme des polluants et donc l'organe le plus exposé. Ceci pourrait expliquer l'impact oxydatif des deux polluants exercés à long terme et à des doses supposées sans effet au cours de cette expérimentation. Cependant le degré de l'impact observé est en relation avec le type du polluant, la capacité cumulative du polluant au sein du tissu adipeux, son métabolisme et au régime alimentaire auquel il est associé. Aussi les mécanismes de toxicité peuvent dépendre aussi de la nature et

Résultats et Discussion

les fonctions de chaque tissu. En fin, plusieurs études attestent que les effets adverses dus à l'exposition aux perturbateurs endocriniens pouvaient largement varier selon l'âge, le sexe, le contexte nutritionnel et la période d'exposition. **(Barouki, 2013 ; Schlienger,2014).**

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'augmentation de l'incidence des maladies nutritionnelles au cours de ces dernières décennies a été principalement attribuée à une interaction gène-environnement néfaste, consécutive à l'accroissement de la sédentarité et aux déséquilibres alimentaires. D'autres facteurs de l'environnement ont été mis en cause. Parmi ceux-ci, figurent les polluants alimentaires tels que les pesticides. Dans la plupart des cas ces substances ont des propriétés hormonales mémétiques, susceptibles d'être nocives. Les études épidémiologiques suggèrent un lien très étroit entre l'exposition à ces polluants et l'incidence des maladies métaboliques comme le diabète de type 2, la stéatose hépatique, et l'obésité. L'objectif de cette présente étude consiste à étudier l'impact d'une exposition chronique, des jeunes rats femelles, à une interaction : régime hypercalorique et tébuconazole (30 µg/kg/j), un fongicide connu pour sa persistance dans l'environnement. Ce travail s'est particulièrement intéressé à la survenue d'une altération oxydative au niveau hépatique. Le mode d'action toxique du tébuconazole a été apprécié en le comparant à celui du bisphénol A (50 µg/kg/j), un perturbateur endocrinien incontestable et le plus répandu dans l'alimentation humaine. Nos résultats indiquent un effet délétère des polluants utilisés au cours de cette étude, sur la balance oxydative hépatique des rats femelles soumises au régime hypergras, et ce malgré leur utilisation à des faibles doses sensées être sans effet nuisible. Ceci est reflété par une augmentation des concentrations hépatiques des MDA, une diminution du pouvoir réducteur ainsi qu'une diminution des marqueurs de l'oxydation protéique hépatique. En revanche, le degré de l'impact observé est en relation avec le type du polluant, la capacité cumulative du polluant au sein du tissu adipeux, et au régime alimentaire auquel il est associé. Cette étude indique clairement que le stress oxydatif est fortement impliqué dans le mécanisme de la toxicité du tébuconazole (TEB), il aurait un impact plus accentué que le Bisphénol A (BPA) sur les paramètres oxydatifs hépatiques. L'exposition chronique à ce pesticide et même à des doses tolérables, pourrait jouer un rôle dans l'apparition des complications et aggraver les conséquences associées aux maladies métaboliques. L'ensembles de ces résultats sont suffisamment convaincants pour remettre en cause l'utilisation excessive des pesticides et envisager un développement d'outils permettant de prédire l'effet potentiellement délétère de ces polluants environnementaux sur la santé et l'environnement, sans attendre leur usage intensif. Aujourd'hui, cette question est devenue un enjeux sanitaire environnemental et socio-économique d'une importance capitale.

Dans cette optique et dans la continuité de cette présente étude, il est fort intéressant d'envisager les perspectives suivantes :

Conclusion et perspectives

- Une évaluation de l'impact du TEB sur l'activité des enzymes antioxydantes et la glutathion -S-transférase.
- Une évaluation de l'influence du TEB sur les paramètres hormonaux tels que les stéroïdes, afin de pouvoir apprécier l'effet perturbateur que ce pesticide peut avoir à une dose dite « sure ».
- Une détermination des conséquences de l'exposition du TEB sur le statut oxydatif au niveau du tissu adipeux.

Références Bibliographiques

A

Acaroz U, Sinan Ince, Damla Arslan-Acaroz, Zeki Gurler, Hasan Huseyni Demirel, Ismail Kucukkurt, Abdullah Eryavuz, Recep Kara, Nuray Varol, Kui Zhu g. (2019). Bisphenol-A induced oxidative stress, inflammatory gene expression, and metabolic and histopathological changes in male Wistar albino rats : protective role of boron, *Toxicology Research*. Royal Society of chemistry, 8(2), pp. 262-269. doi : 10.1039/c8tx00312b.

Ambolet-Camoit A, Ji Kim M, Leblanc A, Aggerbeck M.(2012) Les polluants organiques persistants : implication dans l'obésité et le syndrome métabolique. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*,47(4),pp.183-192.

B

Barouki R. (2013). Interaction entre polluants environnementaux et obésité. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 48(3), pp. 123-128.

BALDI I, CORDIER S, COUMOUL X,et al (2013) Pesticides Effets sur la santé. Édité par Inserm. <http://www.ipubli.inserm.fr>.

Baudin B. (2020). Stress oxydant et protections antioxydantes. *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES*. Elsevier, (522) :22-30. DOI : 10.1016/S1773-035X (20)30159-3.

Ben Othmène Yousra, Intidhar Ben Salem, Hiba Hamdi, Emna Annabi, Salwa Abid-Essefi. (2018). « Communication orale N°3 : implication du stress oxydatif dans la toxicité induite par la toxicité induite par le Tebuconazole in vivo ». In : 7èmes Journées Scientifiques de l'ATT EXPOSITION AUX FAIBLES DOSES ET AUX MELANGES. INTERACTION ET MODULATION DES EFFETS. Tunisie.

Ben Saad H, Kammoun I, Zeghal KH M, Ben Amara I, Magné C, Hakik A. (2017). Effet du selenium sur le stress oxydant au niveau des reins de rats traités par le Tebuconazole Effect of selenium on tebuconazole –induced nephrotoxicity in adult rats , pp.35-42.

Benzie F, Strain J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of « Antioxidant Power » :The FRAP Assay, Department of Health Sciences , Hong Kong Polytechnic University , Hung Hom, Kowloon, Hong Kong ; and Human Nutrition Research Group, University of Ulster, Coleraine , Northern Ireland, United Kingdom.

Références Bibliographiques

Bessaoud O. Pellissier J.-P. Rolland J.-P. Khechimi W. (2019) Rapport de synthèse sur l'agriculture en Algérie. CIHEAM-IAMM, pp.82. hal-02137632

Bonnefont-Rousselot. D. (2014). Obésité et stress oxydant. *Obésité* 9 :8-13.

C

Chevalier N, Fenichel P. (2015) «Obésité, diabète de type 2 et perturbateurs.» *Presse Med* 45(1): 88-97.

Chevalier N, Fenichel P. (2017) «Perturbateurs endocriniens : responsabilités dans l'obésité et le diabète de type 2.» *Médecine des maladies Métaboliques*. Elsevier,11(4),pp: 341-346.
doi :10.1016/S1957-2557(17)30078-0

D

Demarchi E, Baldassari F, Bononi A, Wieckowski MR, Pinton P. (2013). Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases and Obesity : Role of p66Shc and protein kinase C. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 11 pages.

Desbiolles A, Gaillot J. (2019) «perturbateurs endocriniens.». FRPERTUBENDOCR19

E

EFSA- European Food Safety Authority. (2008). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tebuconazole,176 :1-109.

F

Faure P and Lafond J-L. measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation In *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M , P ierreJ-L Publisher Birkhäuser Basel **1995,p237-248.**

G

Gamet-Payraastre L, Lukowicz C.(2017). « Les effets des mélanges de pesticides ». *Cahiers de Nutrition et de Diététique*,52(5),pp.234-238

Références Bibliographiques

Girard L, Reix N, Mathelin C. (2019) « Impact des pesticides perturbateurs endocriniens sur le cancer du sein. » *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie*, 48:187-195. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2015.08.008>

Goudable J, Favier A. (1997) « Radicaux libres oxygénés et antioxydants. » *Nutrition Clinique et Métabolisme*. Elsevier11(2), pp115-120. doi:10. 1016/S0985-0562(97)80058-1.

H

Halliwell B. (1992). «Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System.» *Journal of Neurochemistry* 59(5): 1609-1619. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x.

I

Ismail Kucukkurt, Abdullah Eryavuz, Recep Kara, Nuray Varol, Kui Zhu g. (2019). Bisphenol-A induced oxidative stress, inflammatory gene expression, and metabolic and histopathological changes in male Wistar albino rats : protective role of boron, *Toxicology Research*. Royal Soceity of chemistry, 8(2), pp. 262-269. doi : 10.1039/c8tx00312b.

K

Kamel AH, Foad MA, Moussa HM. (2018). The adverse effects of bisphenol A on male albino rats, *The Journal of Basic and Applied Zooligy*,79(1).

Kjaerstad M.B, Taxvig C, Nellemann C, Vinggaard A.M. and Andersen H R.(2010). Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Repeod.Toxicol.* 30 :573-582.

Kobroob A, Wachirasek Peerapanyasut, Nipon Chattipakorn, Orawan Wongmekiat. (2018). Damaging effects of Bisphenol A on the Kidney and the protection by Melatonin :Emerging Evidences from In Vivo and In Vitro Studies, *oxidative Medicine and Cellular Longevity*, pp.1-15.

L

Luo H, Wang X, Chen C, Wang J, Zou X, Li C, Xu Z, Yang Z, Shi. W, Zeng C.(2015).Oxidative stress Causes Imbalance of Renal Renin Angiotensin System (RAS) Component and Hypertension in Obese Zucker Rats. Journal of the American Heart Association 4 : 001559.

M

Magdelaine C. (2018). Le bisphénol A, perturbateur endocrinien, est interdit dans les contenants alimentaires, mais jusqu'à quand / notre –planete. Info., <https://www.notre-planete.info/actualites/3589bisphenol-A-interdiction-boites-conserves?>

Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A., Parisi E, Rosa GD, Gitto E, Arrigo T.(2015).Oxidative Stress in Obesity : A Critical Component in Human Diseases. International Journal of Molecular Science 16 :378-400.

Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, et al.(2012).Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. Hepatology 55 :395-407.

Michel F, Bonnefont-Rousselot D, Mas E, Draï J, Théron P. (2008). « Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques ». Annales de biologie clinique, ; 66 (6) : 605-20.

Moser V.C, Barone S, Smialowicz R.J, Harris M.W, Davis B.J, Oversteet D, Mauney M, Chapin R.E. (2001). The effect of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological, and reproductive function in rats. Toxicol. Sci. 62 :339-352.

P

Poormoosavi S M, Najafzadehvazi H, Behmanesh M A, Amirgholami R.(2018).Protective effects of *Asparagus officinalis* extract against Bisphenol A- induced toxicity in Wistar rats . Toxicol. Rep.,5,427-433.

S

Savini I, Catani M.V, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. (2013). Obesity-Associated Oxidative stress : Strategies Finalized to Improve Redox State. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 :10497-10538.

Schlienger J, (2014) « Impact métabolique de l'exposition au bisphénol A : état des lieux. » *Médecine des maladies Métaboliques*. Elsevier, 8(3), pp. 340-345. doi : 10.1016/S1957-2557(14)70819-3.

T

Taxvig C, Hass U, Axelstad M, Dalgaard M, Boberg J, Andeasen H.R, Vinggaard A.M. (2007). Endocrine-distrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and expoxiconazole. *Toxicol. Sci.* 100 : 464-473.

Taxvig C, Vinggaard A.M, Hass U, Axelstad M, Metzdorff S and Nellemann C. (2008). Endocrine-distrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. *Int. J. Androl.* 2 :170-177.

V

Vincent H.K and Taylor A.G. (2006). Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in human. *International Journal of Obesity* 30 :400-418.

Y

Yagi K. (1976). A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med Metab* 15 :212-6.

Youness M. (2013) « l'impact de la formulayion et du mélange de deux pesticides (mésotrione et tébuconazole » sur leur biodégradation et la croissance de microorganismes. *Autre*. Université Blaise Pascal, 22378.

Annexes

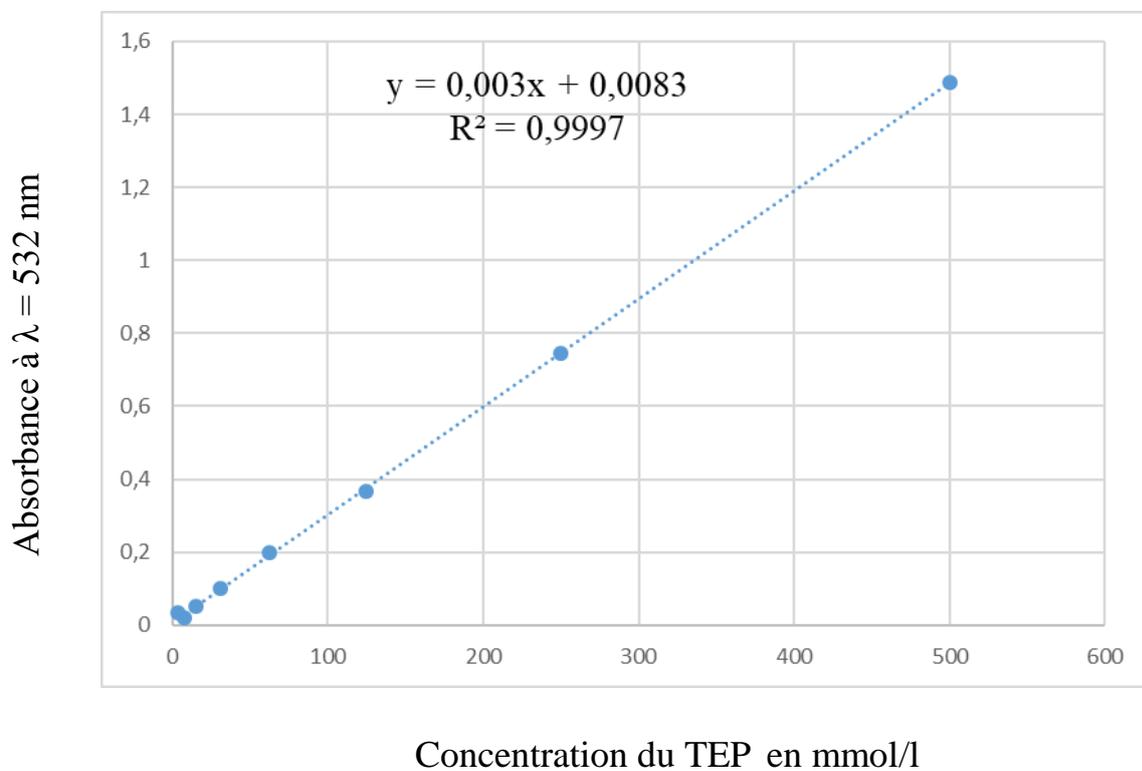


Figure n°08 : courbe d'étalonnage de la TEP en mmol/l

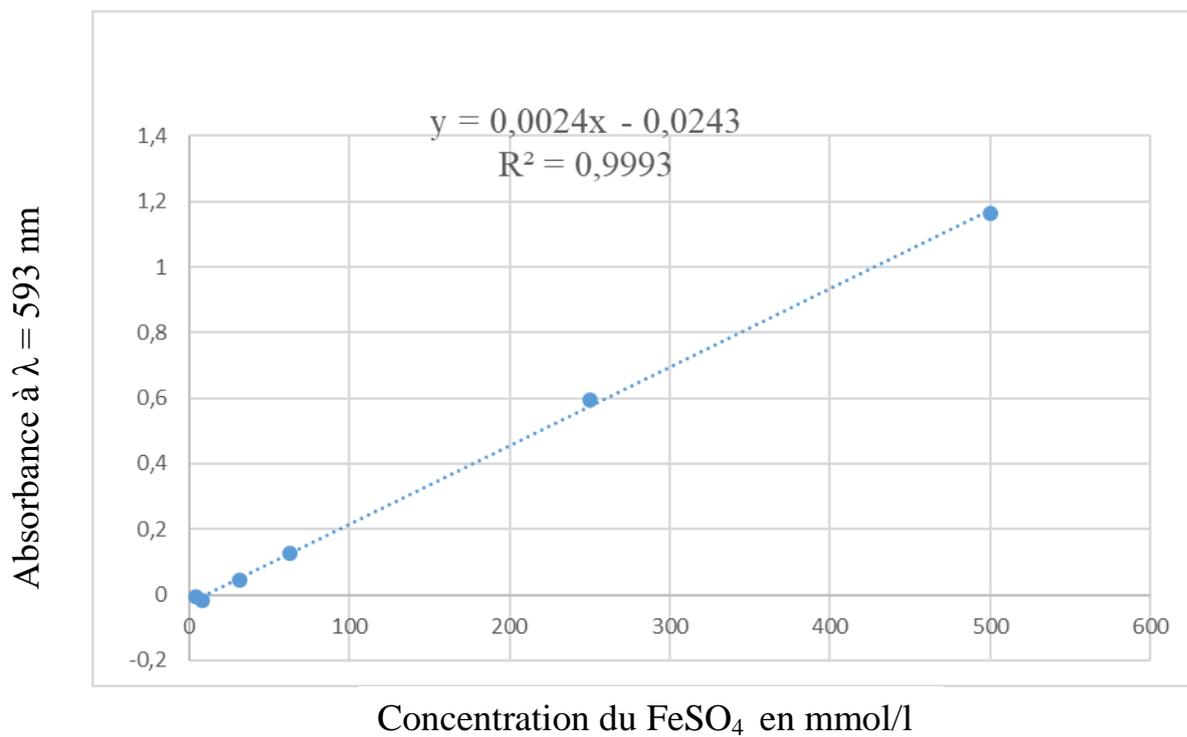


Figure n° 09 : courbe d'étalonnage de la NAC en mmol/l

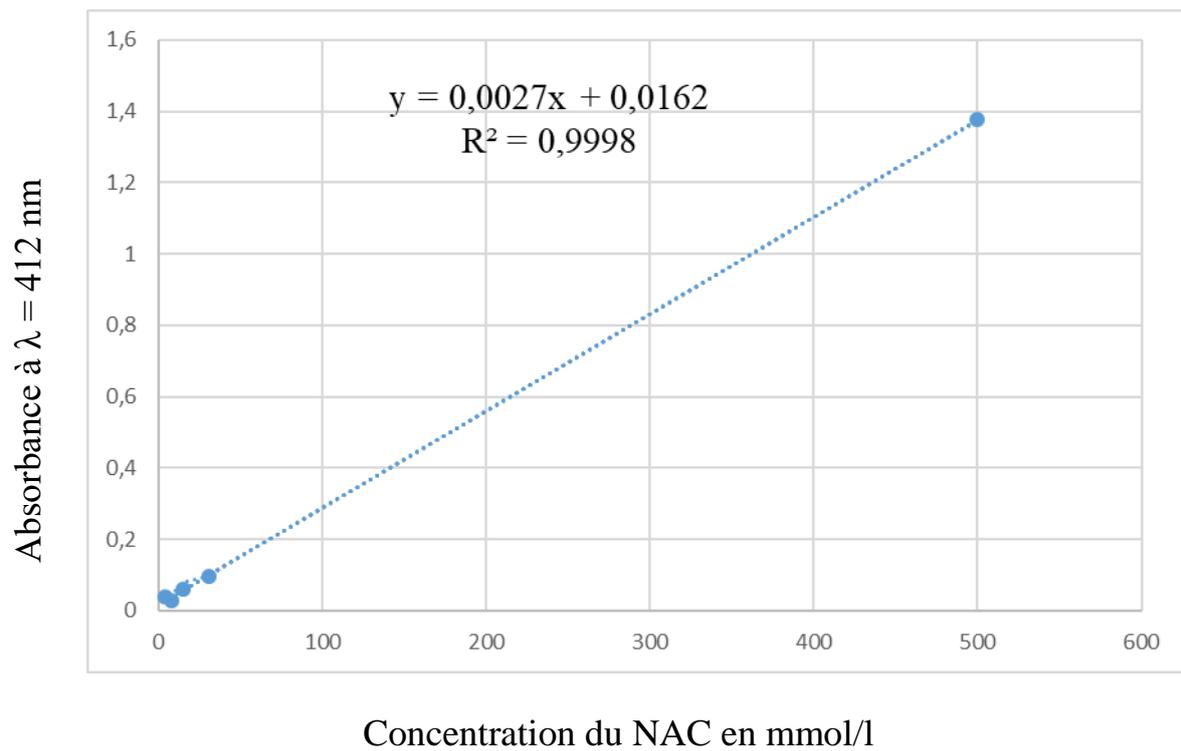


Figure n° 10 : courbe d'étalonnage de la NAC en mmol/l

Préparation du tampon PBS pour la préparation de l'homogénat :

solution	Composants	Masse à peser	Volume final de solution	commentaire
Tampon PBS à PH 7,4 et 1M	KH_2PO_4 1M (136,09g/mol)	0,17 g / 125ml d'eau distillée	500 ml	<ul style="list-style-type: none"> ▪ À 125 ml de K_2HPO_4 (base) ajouter de KH_2PO_4 (acide), puis ajouter NaCl ,on obtient une solution de pH 6,8 ▪ Ajuster le pH de la solution par NaOH (0,5N) jusqu'à PH 7,4 ▪ Conservation à 4°C
	K_2HPO_4 1M (228,23g/mol)	0,285g/125 ml d'eau distillée		
	NaCl (0,9%)	1,8 g /250ml d'eau distillée		

1-Pour la préparation du dosage des protéines oxydées (groupement SH)

1.1-préparation des tampons phosphate à 0.2 M et 0.05 M

a- TP phosphate à 0.2 M :

solution	Composants	Masse à peser	Volume à prendre	commentaire
Tampon phosphate (0,2M)	KH_2PO_4 (acide)	6,80g /250ml d'eau distillée	11ml	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ajuster la solution à pH 8 ▪ Conservation à 4°C pendant 1 mois
	K_2HPO_4 (base)	11,41g /250ml d'eau distillée	189ml	

b- TP phosphate à 0.05 M :

solution	Composants	Masse à peser	Volume à prendre	commentaire
Tampon phosphate (0,5M)	KH_2PO_4 (acide)	1,7g /250ml d'eau distillée	11ml	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ajuster la solution à pH 8 ▪ Conservation à 4°C pendant 1 mois
	K_2HPO_4 (base)	2,85g /250ml d'eau distillée	189ml	

1.2 réactif d'ELLMAN :

solution	Composants	Masse à peser	commentaire
Réactif d'ELLMAN	DTNB	0,04g /10ml de tampon phosphate à 0,2M	<ul style="list-style-type: none"> Conserver la solution à l'abri de la lumière (par papier aluminium)
	Tampon phosphate à 0,2M		

1.2- Solution de la NAC (N-acetyl-cystéine à 1mM) :

solution	Composants	Masse à peser
NAC (N-acétyl – cystéine)	NAC à 1mM	0,0163g /100ml d'eau distillée
	Eau distillée	

2- pour la réalisation du dosage du pouvoir réducteur :

2.1- préparation de tampon acétate a 30mmol :

solution	Composants	Masse à peser	commentaire
Tampon acétate (30mmol)	Acétate de sodium	1,2g /500ml d'eau distillée	<ul style="list-style-type: none"> La solution est ajustée à pH 3,6 en ajoutant l'acide acétique glacial
	Eau distillée		

2.2- préparation de tampon FeCl₃ à 20mmol :

solution	Composants	Masse à peser	commentaire
Tampon FeCl₃ (20mmol)	FeCl ₃	0,324g /100ml d'eau distillée	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agitation
	Eau distillée		

2.3- préparation de tampon FeSO₄ :

solution	Composants	Masse à peser	commentaire
Tampon FeSO₄ (10mmol)	FeSO ₄	0,278 g /10ml d'eau distillée	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agitation ▪ Conserver la solution à l'abri de la lumière (par papier aluminium)
	Eau distillée		

2.4- Préparation de HCL à 36 mmol :

solution	Composants	volume	commentaire
Tampon HCL (36mmol)	HCL 37%	750µl/250ml d'eau distillée	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Retirer 750 µl d'eau distillée et la remplacée par 750µl de HCL
	Eau distillée		

2.5- préparation de tampon TPTZ :

solution	Composants	Masse à peser	commentaire
Tampon TPTZ	TPTZ	0,1g/40ml de HCL	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agitation
	HCL (36mmol)		

2.6- le réactif FRAP :

solution	Composants	volume	commentaire
Le réactif FRAP	TPTZ	5 ml	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Incuber le réactif dans le bain marie à 37°C pendant 10 min ▪ Agitation
	tampon Acétate	50 ml	
	FeCl ₃	5 ml	

3- pour la réalisation du dosage de la peroxydation lipidique :

3.1- préparation du tampon TBARS :

solution	Composants	Masse à peser	Volume	commentaire
tampon TBARS	TCA	20g	100ml d'eau distillée	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mélanger (TCA+BHT) avec (TBA + HCL) pour avoir le réactif TBARS . ▪ Couvrir le réactif TBARS par papier aluminium . ▪ Chauffer le réactif à 40°C dans le bain marie pendant 10min .
	BHT	0,01g		
	TBA	0,375g	0,375g/25ml de HCL (1N)	
	HCL (1N) (55ml d'eau distillée + 5ml HCL)			

3.2- Préparation de réactif TEP à 20 mmol :

solution	Composants	volume	commentaire
Réactif TEP (20mmol)	TEP	480 μ l	▪ Dans une fiole de 100ml met 480 μ L TEP puis compléter le volume par les 100ml d'éthanol
	Ethanol	100ml	



Figure n°11 : Ultra-TURRAX



Figure n°12 : Centrifugeuse



Figure n°13 : Agitateur magnétique



Figure n°14 : Sonicateur



Figure n°15 : La balance



Figure n°16 : Vortex

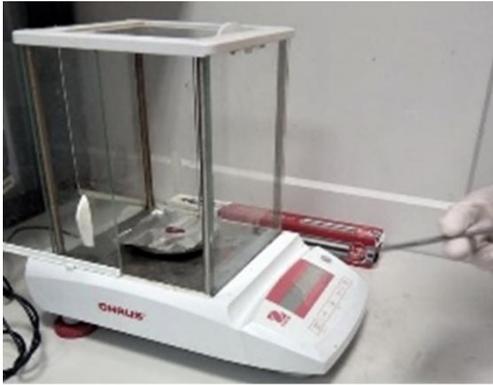


Figure n°17 : La pesée du Foie



Figure n°18 : Broyage du Foie



Figure n°19 : Verser l'échantillon broyé dans des tubes secs



Figure n°20 : Centrifugation de l'échantillon



Figure n°21 : Récupération de surnageons dans les épindorfs



Figure n°22 : Préparation de réactif TBARS



Figure n°23 : Incubation du réactif TBRS



Figure n°24 : L'ajout de butanol pour l'extraction des MDA



Figure n°25 : Résultats du test TBRS

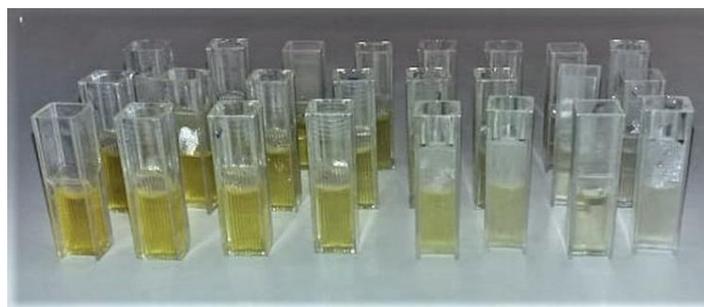


Figure n°26 : Résultats de test thiol (SH)



Figure n°27 : Résultats de test FRAP

Le tébuconazole

Le tébuconazol est un fongicide systémique de la famille des triazoles connu pour sa persistance dans l'environnement. Ce fongicide est lipophile et peu soluble dans l'eau (36 mg/L). Ce composé, solide à température ambiante, est très stable à l'hydrolyse et la photolyse.

Il est largement utilisé dans le traitement des bois et principalement utilisé pour le traitement et la protection d'une grande variété de culture (céréales, soja, vignes, fruits, légumes) contre les rouilles et les fusarioses (Youness.,2013).

Ce fongicide est considéré comme modérément toxique avec des DL50 chez le rat de 1,7 g/kg par voie orale (EFSA.,2008). Toutefois, plusieurs études ont dévoilé son potentiel à risque, notamment lors d'exposition prénatale, sur le développement de neuropathologies (Mosseret al.,2001) ou en tant que perturbateurs endocrinien (Taxvig et al.,2007). Il entraîne une diminution de la formation d'oestradiol et de testostérone et augmente la formation de progésterone, ce qui implique une inhibition des enzymes impliquées dans la conversion de la progésterone en testostérone. Il agit également en tant qu'antagoniste du récepteur androgène conduisant à une féminisation de la progéniture des rats (Taxvig et al.,2008 ;Kjaerstad et al.,2010).

Le Bisphénol A

Le Bisphénol A (BPA) est composé utilisé dans la fabrication de plastique de type polycarbonates ou dans la composition de résines époxy tapissant l'intérieur des conserves alimentaires et canettes. Il est capable de migrer de l'emballage vers l'aliment. Plusieurs études au niveau international ont mis en évidence certaines propriétés dangereuses de cette substance sur la santé, qui a un effet cancérigène et spécialement un effet sur le système endocrinien et perturbe la balance énergétique (obésogène) chez les rongeurs. (Ivry-Del Moral et al., 2011).

En 2011, l'Agence de sécurité de l'alimentation (Anses) a notamment publié deux rapports : l'un relatifs aux effets sanitaires du bisphénol A, l'autre ses usages. Ce travail avait mis en évidence des effets sanitaires, avérés chez l'animal et suspectés chez l'homme, même à de faibles niveaux d'exposition. Depuis le 1^{er} janvier 2015, l'interdiction du BPA a été conditionnée directement en contact avec les denrées alimentaires : canettes, boîtes de conserve et couvercles métalliques (Magdalaine.,2018)

Pathologie – Toxicologie :

Chez le rat, le tébuconazole est bien absorbé par voie orale, il est largement distribué et métabolisé dans l'organisme. Son élimination est biliaire et urinaire sous forme de métabolites oxydés et conjugués. Chez l'homme un schéma métabolique similaire est rapporté.

Chez l'animal :

Après une administration unique par voie orale aux doses de 2 mg/kg pc ou 20 mg/kg pc chez le rat, le tébuconazole est rapidement et largement absorbé. Des résultats similaires sont observés après une administration répétée (14 jours) à la dose de 2 mg/kg pc/j. Après 48h, 98 % de la dose administrée est retrouvée dans la bile et les urines. La concentration plasmatique maximale (Tmax) est atteinte une à deux heures après administration. Des études in vivo montrent une pénétration percutanée du tébuconazole de 13 % et de 55 % chez le singe rhésus et le rat respectivement.

Distribution :

Le tébuconazole est largement distribué dans l'organisme, principalement dans les organes d'élimination et de biotransformation (les reins et le foie). Le taux de résidus chez le mâle est 1,5 à 2,5 fois plus important que chez la femelle. Le tébuconazole ne présente toutefois pas de potentiel d'accumulation. Dans les deux sexes, 72 heures après la dernière administration (2 mg/kg pc/j pendant 14 jours), la radioactivité résiduelle dans la carcasse et les organes représente moins de 1 % de la radioactivité administrée.

Métabolisme :

Chez le rat, après administration orale, le métabolisme du tébuconazole est très important. Dans les fèces et les urines, la molécule parent représente moins de 2 % de la radioactivité administrée. Les principales voies métaboliques sont des réactions d'oxydation suivies de glucurono-conjugaison et sulfo-conjugaison. De plus, une voie métabolique mineure de clivage de la molécule parent libère le 1,2,4-triazole retrouvé dans les urines à hauteur 5 % et 1,5 % de la radioactivité administrée chez le mâle et la femelle respectivement.

Élimination :

Après administration unique par voie orale chez le rat (doses testées : 2 et 20 mg/kg pc), le tébuconazole est rapidement excrété durant les premières 72 heures, principalement par les fèces (65-80 %) et secondairement dans les urines (16-35 %). Des résultats similaires sont observés après une administration répétée de 14 jours à la dose de 2 mg/kg pc/j. L'excrétion biliaire est plus importante chez le mâle (80 %) que chez la femelle (65 %). Une part infime

de la radioactivité (0,032 %) est détectée dans l'air exhalé dans les 3 jours suivant une administration orale de 20 mg/kg pc chez le rat.

Chez l'homme :

L'identification des métabolites urinaires de sept travailleurs agricoles exposés au tébuconazole lors de traitement sur vignes a montré une prédominance des formes hydroxylée, carboxylée et glucurono-conjugée de la molécule parent signant un schéma métabolique chez l'homme similaire à celui observé chez le rat.

Toxicité expérimentale :

Toxicité subchronique, chronique :

Lors d'expositions sub-chronique et chronique au tébuconazole par voie orale, les organes cibles identifiés sont le foie chez les rongeurs et le chien, les glandes surrénales chez le chien et le rat ainsi que les yeux (cataracte) chez le chien. Le tébuconazole présente une faible toxicité locale lors d'expositions répétées par voie cutanée chez le lapin. Après exposition répétée par inhalation, le tébuconazole induit des effets hépatiques chez le rat et n'induit pas de cataracte chez le chien et le chat.

Effets génotoxiques :

In vivo Le potentiel clastogène du tébuconazole a été testé dans un test du micronoyau sur cellules de moelle osseuse chez la souris. Dans cette étude, le tébuconazole n'induit pas d'augmentation de la fréquence des micronoyaux dans les érythrocytes polychromatiques après une administration par voie orale aux doses de 200, 500 et 2000 mg/kg pc/j. Des résultats négatifs sont également obtenus dans un essai de mutation létale dominante réalisé chez la souris mâle à la dose de 2000 mg/kg pc/j par voie orale.

Effets cancérogènes :

Le tébuconazole n'est pas cancérogène chez le rat. Chez la souris, le tébuconazole induit des tumeurs hépatocellulaires à la plus forte dose testée (supérieure à la dose maximale tolérable).

Effets sur la reproduction :

Le tébuconazole n'entraîne pas de modifications des paramètres de la reproduction dans une étude sur deux générations. Une augmentation de la durée de gestation est cependant observée en présence d'une toxicité générale modérée dans une étude de neurotoxicité pour le développement via l'alimentation chez le rat. Dans les études de toxicité pour le développement par voie orale, des effets tératogènes sont observés en l'absence de toxicité maternelle chez la souris et le lapin et en présence d'une faible toxicité maternelle chez le rat. Aux mêmes doses, le tébuconazole provoque des effets embryo et fœto-toxiques chez le rat et

le lapin ainsi que des effets foeto-toxiques chez la souris. Dans les études de toxicité pour le développement par voie cutanée, le tébuconazole n'est pas toxique pour le développement chez le rat mais induit des effets tératogènes chez la souris en présence de toxicité maternelle

Effets perturbateurs endocriniens :

Le tébuconazole montre un potentiel d'altération des signalisations œstrogénique et androgénique. Son impact sur la stéroïdogénèse serait à l'origine des effets sur le système reproducteur observés chez le rat à des doses provoquant une toxicité générale. Le tébuconazole à l'instar d'autres fongicides triazolés a fait l'objet d'un programme de recherche danois pour ses propriétés de perturbation endocrinienne, publié en 2007. De plus il fait parti de la première liste des substances testées pour leurs propriétés de perturbation endocrinienne par l'agence américaine pour l'environnement (US-EPA). Ainsi, une batterie de tests in vitro et in vivo sont disponibles. Voie de signalisation œstrogénique In vitro, le tébuconazole donne des résultats négatifs dans les tests de liaison et de transactivation du récepteur œstrogénique (ER). En revanche il altère la stéroïdogénèse et inhibe l'activité de l'aromatase. In vivo, un délai de l'ouverture vaginale est observée dans un essai de puberté chez le rat femelle en présence d'une toxicité générale faible à modérée (doses testées 0, 75 et 150 mg/kg pc/j par gavage). Cette altération de la voie de signalisation œstrogénique corrobore les effets observés dans les études réglementaires tels que l'augmentation du temps de gestation et l'augmentation des pertes post-implantatoires. Voie de signalisation androgénique Les essais in vitro réalisés montrent que le tébuconazole est un antagoniste du récepteur androgénique et inhibe la stéroïdogénèse. Ces effets anti-androgéniques ne sont pas retrouvés in vivo dans deux tests de Hershberger. Cependant, une baisse de la testostérone et du poids des organes androgène-dépendants, ainsi qu'un délai de la séparation balano-preputiale sont notés dans un essai de puberté chez le rat mâle en présence d'effets hépatiques (doses testées 0, 75 et 150 mg/kg pc/j par gavage). Dans les études réglementaires, le tébuconazole n'a pas montré d'activité anti-androgénique chez le rat mâle adulte. Voie de signalisation thyroïdienne Aucun effet sur l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien n'a été constaté dans les essais de puberté chez le rat mâle et le rat femelle. Les effets observés dans un test de métamorphose des amphibiens sont attribués à une forte toxicité générale notamment hépatique. Dans les études réglementaires, le tébuconazole n'a pas provoqué d'effet sur les glandes thyroïdes. **(Inrs.,2017).**

Toxicocinétique – Métabolisme :

L'absorption du bisphénol A est rapide et importante après exposition orale et cutanée. Il est distribué dans les tissus, franchit la barrière placentaire et passe dans le lait maternel. Les métabolites sont majoritairement éliminés dans les fèces ; moins de 10 % sont éliminés sous forme inchangée.

Chez l'animal :**Absorption :**

Après exposition orale, l'absorption dans le tractus gastrointestinal est rapide et importante, cependant aucune quantification n'a été réalisée. Le pic des molécules radiomarquées dans le sang est atteint 5 minutes après exposition orale au C]-bisphénol A pour les faibles doses (10 mg/kg) et après 15 minutes pour les plus fortes (100 mg/kg) ; la concentration maximale augmente linéairement avec la dose. Les taux de bisphénol A diminuent ensuite, avec un rebond à 3 heures (100 mg/kg) ou 6 heures (10 mg/kg) en lien probablement avec un cycle entéro-hépatique. Il n'y a pas d'étude de la toxicocinétique du bisphénol A après exposition par inhalation ; toutefois, compte tenu du coefficient de partage et de certains signes de toxicité systémique, une forte absorption du bisphénol A est également attendue par voie inhalatoire. Après exposition cutanée in vitro (peau humaine dermatomée), le bisphénol A pénètre rapidement dans la peau [11]. Les récentes études disponibles suggèrent un taux d'absorption percutanée compris entre 10 et 60 %, encadrant une valeur plus probable de 27 %.

Distribution :

La distribution du bisphénol A dans l'organisme n'a pas été étudiée spécifiquement. Chez des rates exposées 14 jours après la mise basse, on retrouve, 8 heures après l'exposition, 77 % de la dose administrée dans le lait, le sang, le plasma, les tissus et la carcasse, et le reste dans le foie, les reins et les poumons ; le transfert vers les petits par le lait est limité (moins de 0,01 % dans les carcasses des petits après 2 à 24 heures). 10 minutes après l'exposition des rates gestantes, le bisphénol A est détecté dans le foie et les reins des fœtus, il atteint sa concentration maximale en 20 minutes puis diminue en 6 heures jusqu'à 5 % de son maximum en suivant la baisse de concentration dans le sang maternel.

Métabolisme :

In vitro, des hépatocytes de rat en culture, incubés avec du bisphénol A pendant 2 heures, produisent un métabolite majeur identifié comme du bisphénol Aglucuronide et deux métabolites mineurs, le 5-hydroxybisphénol A et le bisphénol A-sulfate, formés uniquement à forte dose et suggérant une saturation métabolique. In vivo, le taux de bisphénol A-

glucuronide sanguin est inversement proportionnel à la dose (96 à 76 % pour des doses orales de 10 à 100 mg/kg) dans les 10 premières minutes suivant l'exposition ; le composé parental représente 2 à 8 %. Après un temps plus long (45 minutes pour les mâles et 18 heures pour les femelles), 100 % du bisphénol A est sous forme glucuronide pour la faible dose dans les 2 sexes comparé à 68 % (mâles) et 98 % (femelles) à la forte dose. Le composé parental représente 11 % (mâles) et 2 % (femelles) ; sa présence dans le sang longtemps après l'exposition peut être due soit au cycle entéro-hépatique soit à un clivage intestinal du conjugué (après exposition sous-cutanée le composé parental n'est pas détecté)

Elimination :

Le bisphénol A, après exposition orale du rat, est éliminé essentiellement sous forme glucurono-conjuguée (simple ou double), majoritairement dans les fèces (61-63 % et 71-75 % de la dose respectivement) et dans une moindre mesure dans les urines, plus par les femelles que par les mâles (19-20 % et 8-10 % de la dose respectivement). Le composé parental éliminé dans les urines représente 2 à 10 % de la dose selon la souche de rat. Un métabolite mineur, le bisphénol A-sulfate a été détecté dans les fèces (4-5 % de la dose (mâles) et 2-4 % (femelles)). Une excrétion dans le lait maternel du bisphénol A et/ou de ses métabolites a également été montrée. L'élimination est rapide, la majorité de la dose absorbée est éliminée en 72 heures. La demi-vie d'élimination est de 9,7 heures après exposition orale. Dans la carcasse, on retrouve après 7 jours entre 0,03 % et 0,35 % de la dose orale ; dans les tissus (foie et reins), il reste moins de 0,02 %. Chez le singe, exposé par voie orale à 100 µg/kg de [C]-bisphénol A, les molécules radiomarquées sont éliminées dans l'urine (82-84 % de la dose après 7 jours) et dans les fèces (2,14 % mâles et 3,08 % femelles). L'excrétion urinaire est maximale pendant les 12 premières heures et complète en 24 heures [15]. De nombreux métabolites, formés par oxydation, ont été mis en évidence in vitro en présence d'activateurs métaboliques (4-méthyl-2,4-bis(p-hydroxyphényl)pent-1-ène, isopropyl-hydroxyphénol, glutathionyl-phénol, glutathionyl 4-isopropylphénol, et bisphénol A dimères) ; cependant, à ce jour, ils n'ont pas été retrouvés in vivo.

Chez l'homme :

Les études de toxicocinétique chez l'homme, par voie orale, indiquent une absorption importante, une biotransformation au premier passage et une élimination rapide du bisphénol A via les urines [3, 12]. Chez des volontaires exposés à une faible dose par voie orale (54-88 mg/kg [H -bisphénol A]), seul le bisphénol A- glucuronide est mesuré dans le plasma. Le pic plasmatique de la molécule conjuguée est atteint en 80 minutes et sa concentration

plasmatique diminue de façon exponentielle avec une demi-vie de 89 minutes. Son volume de distribution suit celui de l'eau intra- et extracellulaire, sans fixation évidente aux protéines plasmatiques. Le glucuronide est libéré par le foie dans la circulation systémique et excrété dans l'urine ; il n'a pas été mis en évidence de cycle entéro-hépatique comme chez les rongeurs. La concentration urinaire atteint un pic 6 heures après administration puis diminue rapidement avec une demi-vie de 5 heures. Il n'y a pas de différence d'excrétion entre les sexes. Quelques études montrent la présence, chez l'homme, d'une sulfatation du bisphénol A. Cette substance exerce une faible activité œstrogénique, son dérivé glucurono-conjugué aucune. Après administration orale chez l'homme, la conjugaison et l'élimination sont rapides et quasiment totales ; la concentration sanguine de bisphénol A libre disponible pour une fixation aux récepteurs oestrogéniques est donc très faible ($< 1,25 \mu\text{g/L}$).

Toxicité expérimentale :**Toxicité subchronique, chronique :**

A la suite d'une exposition répétée par voie orale au bisphénol A, le foie et les reins sont les principaux organes cibles. Lors d'une exposition par voie inhalatoire, de l'hyperplasie et une inflammation sont rapportées au niveau des épithéliums du tractus respiratoire.

Chez le rat, à la suite d'une exposition répétée par inhalation (corps entier), sont observées une inflammation de l'épithélium olfactif nasal et une hyperplasie de l'épithélium du tractus respiratoire. Inflammation et hyperplasie sont légères à 50 mg/m (6h/j, 5j/sem pendant 13 semaines), n'augmentent pas en sévérité avec la concentration et sont totalement réversibles en 12 semaines. À partir de ces résultats, la NOAEL est de 10 mg/m [7]. Chez la souris de fortes concentrations provoquent faiblesse générale et difficultés respiratoires ; à l'autopsie, des lésions hépatiques et rénales sont notées [13]. Par voie orale, chez le rat, on observe une baisse de poids corporel et une diminution du poids absolu de certains organes (foie, reins, glandes surrénales, rate, cerveau) après une exposition des animaux sur 3 générations à 0,001-0,02-0,3-5-50 et 500 mg/kg/j [13]. Une dégénérescence des tubules rénaux est par ailleurs observée chez les femelles exposées à la plus forte dose. La NOAEL a été fixée à 50 mg/kg/j, bien que les effets sur les poids absolus des organes n'ont pas été retrouvés dans les 3 générations et ne suivent aucune relation dose-réponse. Chez la souris, la cible du bisphénol A est le foie (hypertrophie centrolobulaire, hépatocytes géants multi nucléés, surtout chez le mâle) à partir de 50 mg/kg/j pendant 13 semaines. Chez les animaux exposés à la plus forte dose (600 mg/kg/j), sont rapportées une diminution de poids corporel, une augmentation du poids absolu des reins et du foie ainsi qu'une néphropathie (uniquement chez les mâles). À partir de ces résultats, la NOEL a été fixée à 30 mg/kg/j. Chez le chien, la

seule modification est une augmentation du poids relatif du foie ; la NOAEL est de 80 mg/kg/j, après 90 jours d'exposition.

Effets génotoxiques :

Le bisphénol A n'est ni mutagène ni clastogène in vitro ou in vivo . Cependant, il perturbe le fuseau mitotique ou méiotique, induit une aneuploïdie et engendre des adduits à l'ADN. In vivo , une augmentation du nombre de micronoyaux, d'aberrations structurales et de dommages à l'ADN a été mise en évidence dans les cellules de moelle osseuse de souris. In vitro, le bisphénol A n'est ni mutagène ni clastogène pour les cellules en culture. Des résultats négatifs sont obtenus dans les différents tests d'Ames réalisés, les essais d'échanges de chromatides sœurs ou d'aberration chromosomique, avec ou sans activation métabolique [3, 13]. En revanche, il produit 1 ou 2 adduits majeurs et plusieurs adduits mineurs avec l'ADN purifié (en présence de peroxydase) ou cellulaire (cellules embryonnaires de hamster syrien), provoque des cassures simple brin de l'ADN d'hépatocytes de rat en culture, induit une aneuploïdie (cellules avec 2 à 6N chromosomes) dans les cellules embryonnaires de hamster syrien, des effets sur le fuseau mitotique et des micronoyaux (cellules V79 hamster chinois) [3]. In vivo, deux adduits majeurs à l'ADN et plusieurs adduits mineurs ont été mis en évidence dans le foie du rat mais pas identifiés. Le bisphénol A provoque des perturbations dans la méiose des oocytes chez la souris (mauvais alignement des chromosomes sur le fuseau au cours de la métaphase de la 1^{me} méiose) et une augmentation de l'aneuploïdie [3]. Les autres tests pratiqués ont donné des résultats négatifs (létalité récessive liée au sexe chez la drosophile ; létalité dominante chez le rat ; micronoyaux dans la moelle osseuse de la souris) [3]. Dans une étude récente, des rats ont été exposés à des concentrations croissantes de bisphénol A (de 2,4 µg/kg pc à 50 mg/kg pc), par voie orale, quotidiennement pendant 6 jours. Des augmentations significatives du nombre de micronoyaux dans les cellules de moelle osseuse, d'aberrations structurales des chromosomes et de dommages à l'ADN dans les lymphocytes sanguins ont été mesurées [14]. De plus, sont mis en évidence une augmentation du taux d'adduits à l'ADN (8-OHdG) dans le plasma, signe d'un stress oxydant, une hausse de la peroxydation lipidique ainsi qu'une diminution de l'activité GSH dans le foie. À partir de ces résultats, les auteurs concluent quant à l'activité génotoxique du bisphénol A, dont le stress oxydatif pourrait être un des mécanismes menant à la toxicité génétique.

Effets cancérigènes :

Le bisphénol A n'est pas cancérigène par voie orale chez le rat et la souris ; toutefois, il induit une légère augmentation, non significative statistiquement, des cancers du système hématopoïétique et des glandes mammaires. Des effets sur la glande mammaire des petits sont

observés lors d'expositions pré ou périnatales. Le bisphénol A n'est pas cancérigène *in vitro* pour les cellules embryonnaires de hamster syrien dans le test de transformation cellulaire [3]. *In vivo*, le bisphénol A n'a pas montré d'activité cancérigène significative par voie orale chez le rat (0-1000-2000 ppm dans la nourriture soit 0-74-135 à 148 mg/kg/j pendant 103 semaines). On note une baisse de la prise de poids et de nourriture, une légère augmentation, non significative statistiquement, des leucémies dans les 2 sexes et de la fréquence des fibroadénomes de la glande mammaire chez les mâles. Chez la souris (0-1000-5000 ppm dans la nourriture soit 0-120-600 mg/kg/j chez le mâle et 0-5000-10000 ppm soit 0-650-1300 mg/kg/j chez la femelle pendant 103 semaines), seules sont observées une baisse de poids et une légère augmentation, non significative statistiquement, de l'incidence des lymphomes chez les mâles [3]. Aucune étude n'est disponible par inhalation ou par voie cutanée. L'exposition des rates, pendant la gestation et la lactation, jusqu'à 120 mg/kg/j ne prédispose pas leur descendance à développer un cancer de la prostate [15]. Les études par voie orale, chez le rat, montrent que le bisphénol A n'exerce pas d'activité promotrice, jusqu'à des taux d'exposition relativement élevés, sur les cancers de la prostate, l'utérus, la thyroïde, les poumons, le foie, le thymus et l'œsophage [3, 15, 18, 19]. Dans des études qui, cependant, comportent certaines faiblesses méthodologiques, de relativement faibles doses de bisphénol A (administré en sous-cutané) augmentent l'incidence des lésions pré-néoplasiques et néoplasiques de la prostate induites par des hormones (œstradiol + testostérone) ainsi que le taux de lésions hyperplasiques et de carcinomes cribriformes de la glande mammaire induits par la N-nitroso-N-méthyle urée.

Effets sur la reproduction :

Les effets du BPA sur les organes reproducteurs mâles et femelles, liés à une exposition à l'âge adulte des rongeurs, se traduisent notamment par une diminution de la production de spermatozoïdes, une modification des concentrations en hormones sexuelles ou de la durée des cycles œstraux. De nombreux effets sur le développement, variables en fonction de la période d'exposition, ont été mis en évidence. Les effets sur le système reproducteur femelle, le développement cérébral, le métabolisme lipidique, le système immunitaire et la glande mammaire chez les petits sont avérés suite à des expositions pré- ou périnatales. Des effets sur le système reproducteur mâle, le comportement maternel, la thyroïde et l'intestin sont aussi suspectés, notamment suite à des expositions à la puberté ou à l'âge adulte. Des controverses subsistent toujours concernant par exemple les potentiels effets neurocomportementaux ou sur la prostate.

Effets sur le métabolisme lipidique et glucidique et le système cardio-vasculaire :

Effets avérés : augmentation de la lipidémie, tendance à la surcharge pondérale et une activation de la lipogénèse, suite à une exposition pré, périnatale ou à l'âge adulte.

Effets controversés : effets sur le métabolisme du glucose suite à une exposition pré ou périnatale. L'exposition de rates à 40 µg/mg pc/j de BPA par gavage, pendant la gestation et la lactation (génération F0), (les générations F1 et F2 n'ayant plus été exposées par la suite), a entraîné une intolérance au glucose chez les nouveau-nés mâles de la génération F2, plus marquée que chez les nouveau-nés femelles. Une exposition au BPA pré pubertaire (voie orale, PND 21 à 35 ; 0,25 – 2,5 – 25 ou 250 µg/kg pc/j), en plus d'une exposition périnatale (sous cutanée, à partir du 8 jour de gestation jusqu'à la fin de la lactation), exacerbe les effets du BPA sur le poids corporel et la masse grasseuse des souris femelles à partir de 25 µg/kg pc/j ; chez les mâles, les différences semblent être moins importantes [37]. Des études récentes indiquent que ces effets peuvent impliquer les voies des œstrogènes (comme ERα ou ERβ) ou d'autres hormones impliquées dans l'insulinorésistance et la lipogénèse [25]. De plus, le pancréas apparaît désormais comme une cible potentielle du BPA, les mécanismes impliqués différant selon que l'exposition se produit in utero ou à l'âge adulte ; les effets morphologiques et fonctionnels rapportés étant à l'origine d'altérations de la synthèse et/ou de la sécrétion d'insuline.(Inrs.,2018).

Déjà accusés de jouer un rôle dans la baisse de la fertilité masculine et l'évolution foetale, les perturbateurs endocriniens, à l'instar des pesticides, auraient aussi un effet nocif dans la survenue de l'obésité et du diabète de type 2. Les pesticides à forte dose étaient redoutables pour l'environnement et la santé, mais les études actuelles soupçonnent même les faibles doses sensées être sans effet nuisible sur la santé humaine. Cette présente étude s'intéresse à évaluer l'effet toxique d'un pesticide, le tébuconazole (TEB), à faible dose, introduit dans un régime hypercalorique (hypergras) pour mimer un scénario d'exposition réaliste et chronique. L'effet toxique de ce fongicide a été comparé à celui du Bisphénol A (BPA). Les résultats obtenus révèlent que l'exposition au TEB et le BPA de manière concomitante au régime hypergras, accentue le développement du stress oxydant au niveau hépatique des jeunes rats femelles de souche Wistar. Ceci est reflété par une augmentation des concentrations des MDA ainsi qu'une diminution du pouvoir réducteur et des marqueurs de l'oxydation protéique au niveau hépatique. Le TEB aurait un impact plus accentué sur ces paramètres en comparaison avec le BPA. Cette étude indique clairement que le degré de l'impact observé est en relation avec le type du polluant, la capacité cumulative du polluant au sein du tissu adipeux, et au régime alimentaire auquel il est associé. L'ensemble de ces données sont suffisamment probantes pour incriminer le stress oxydatif dans le mécanisme de la toxicité du tébuconazole.

Mots clés : Tebuconazole, Bisphénol A, pollution environnementale, rat Wistar, stress oxydatif, toxicité chronique, perturbateurs endocrinien

متهمة بالفعل بأنها تلعب دورًا في تراجع خصوبة الذكور وتطور الجنين، فإن المواد الكيميائية المسببة لإختلال الغدد الصماء، مثل المبيدات الحشرية، سيكون لها أيضًا تأثير ضار في ظهور السمنة ومرض السكري من النوع 2. إن المواد الفعالة في المبيدات الحشرية بجرعات عالية كانت خطيرة على البيئة والصحة، لكن الدراسات الحالية تشته حتى في الجرعات المنخفضة التي من المتوقع ألا يكون لها آثار ضارة على صحة الإنسان. تبحث هذه الدراسة في التأثير السام لمبيد الفطريات، تم إضافة جرعة منخفضة من تيبوكونازول في نظام غذائي عالي السعرات الحرارية لتقليد سيناريو التعرض الواقعي والمزمن. تم مقارنة التأثير السام لهذه المبيدات الفطرية بتأثير البيسفنول أ، الذي هو مسبب لإختلال وظائف الغدد الصماء لا جدال فيه والأكثر انتشارًا في أغذية الإنسان. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن التعرض لتيبوكونازول (TEB) والبيسفنول أ (BPA) بالتزامن مع إتباع نظام غذائي عالي الدهون، يضاعف من تطور الإجهاد التأكسدي في كبد إناث الفئران الصغيرة من سلالة ويستار. وينعكس هذا من خلال زيادة تركيزات MDA وكذلك انخفاض كبير في قدرة الحد وعلامات أكسدة بروتين الكبد. الملوث TEB سيكون له تأثير أكبر على هذه المعايير مقارنة بتأثير BPA. تشير هذه الدراسة بوضوح إلى أن درجة التأثير الملحوظ تتعلق بنوع الملوثات، والقدرة التراكمية للملوثات داخل الأنسجة الدهنية، والنظام الغذائي المرتبط بها. جميع هذه البيانات مقنعة بما يكفي لتجريم الإجهاد التأكسدي في آلية سمية التيبوكونازول.

الكلمات الدالة: تيبوكونازول، بيسفنول أ، التلوث البيئي، فئران ويستار، خلل تأكسدي، سمية مزمنة المواد، الكيميائية المسببة لإضطرابات الغدد الصماء.