

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

جامعة سعد دحلب البليدة  
UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA



FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES ET  
BIOLOGIQUES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

PROJET DE FIN D'ETUDES  
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER 2 EN  
BIOLOGIE  
OPTION : MICROBIOLOGIE ET TOXICOLOGIE ALIMENTAIRE

***ETUDE DE LA REPROTOXICITE DE DI(2-  
EHYLHEXYL)PHTALATE (DEHP) CHEZ LE RAT WISTAR  
ET METHODOLOGIE ANALYTIQUE DE SUIVI DE SA  
MIGRATION DANS QUELQUES SIMULANTS DE DENREES  
ALIMENTAIRES***

Jury composé de :

- Présidente :

Mme CHAKHMA A, MAA à USDB

- Examinatrices :

Mme DJAZOULI F/Z, MAA à USDB

Mme KHALDOUN H, MAA à USDB

- Réalisé par :

M<sup>elle</sup> OUDIR Malha

Encadré par :

- Promotrice :

Mme AIT MESBAH Z, MAA à USDB

- Co-promotrice :

AZINE K, responsable de laboratoire  
pharmacotoxicologie de CRD SAIDAL.

Année universitaire 2012- 2013

**Remerciements**

*Ce travail a été réalisé au Centre de Recherche et de Développement (CRD) SAIDAL. Durant toute cette période j'ai eu la chance de rencontrer plusieurs personnes qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail, qui m'ont conseillée et surtout qui m'ont beaucoup apporté dans tous les sens du terme.*

*Mes remerciements s'adressent dans un premier temps à l'ensemble des membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Je tiens à remercier Mme CHAKHMA A pour avoir accepté de présider ce jury. Je suis très reconnaissante envers Mme DJAZOULI F/Z et Mme KHALDOUN H, d'avoir accepté d'être les examinatrices de ce travail.*

*J'exprime ma grande reconnaissance et mes sincères remerciements à ma promotrice Mme AIT MESBAH Z pour ses conseils avisés durant ce travail et la confiance qu'elle m'a accordée.*

*Je remercie vivement ma copromotrice Mme AZINE K, responsable du laboratoire pharmacotoxicologie de CRD pour m'avoir accueilli au laboratoire pharmacotoxicologie, pour sa gentillesse et ses conseils.*

*Je tiens à remercier la société ENPC notamment Mme MENASRIA directrice du département technique, d'avoir accepté me fournir les matières premières (PVC et DEHP) nécessaires pour la réalisation de ce travail.*

*Je tiens à remercier la responsable de laboratoire analytique pour m'avoir accueilli au laboratoire, mes chaleureux remerciements s'adressent également à Zahra, responsable de l'appareil FTIR qui m'a apporté une aide précieuse, pour sa gentillesse et sa confiance.*

## Remerciements

---

*Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude et mes remerciements à Mr BOUZIANE M, l'animalier de CRD pour son aide et ses conseils durant toute la durée de mon stage.*

*Je tiens aussi à adresser ma gratitude à Mme TOUAZI de CRD pour son aide et ses conseils.*

*Ma sincère reconnaissance et mes vifs remerciements à Mr SCHADER, le chef de service de laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques (LNCP) de m'avoir accueilli au laboratoire pour réaliser l'étape de déshydratation des organes, pour sa confiance et surtout pour ses conseils. Je remercie également tout le personnel du laboratoire tout particulièrement Melle AMI, Mr ABD ELGHANI et Dr ALOUACHE pour leur aide.*

*J'exprime ma grande reconnaissance et mes sincères remerciements à Mme DARDOU de m'avoir accueilli au laboratoire d'anatomie pathologie de l'Ecole vétérinaire, je remercie tout particulièrement le technicien de laboratoire pour m'avoir autorisé de manipuler et à Mme ZOUAMBI, spécialiste en histologie animale à l'ENV d'avoir accepté me faire la lecture de mes coupes histopathologiques.*

*Je remercie chaleureusement Mr ABD ELOUAHID pharmacien toxicologie à l'institut Pasteur d'Algérie pour l'intérêt qui a porté à mon travail, pour son aide, pour ses conseils et son encouragement.*

*Je remercie également Mr NOUAS, responsable de service contrôle à l'institut Pasteur Algérie, et pour ses conseils.*

*Je souhaiterais finir en remerciant toutes les personnes qui m'ont encouragé pour finir ce travail.*

*Dédicaces*

*Je dédie ce travail à :*

*Mes chers parents*

*Mes frères et sœurs*

*Ma très chère amie DERRICHE Fariza*

*Mes amie (s) particulièrement Mounia, Lila,*

*Amine et Hamza*

*A tous ceux qui me sont chers*

### Résumé

L'objectif de cette étude consiste à évaluer les effets toxiques pour la reproduction et de mettre en place une méthodologie analytique simple et pertinente pour le suivi de la migration du DEHP d'un film en PVC plastifié vers quelques milieux simulants de denrées alimentaires. Dans la première partie de ce travail nous avons étudié l'effet d'une exposition *in utero* et pendant la lactation au DEHP sur l'appareil reproducteur de rat mâle. Nos résultats ont montré une altération importante de la morphologie et de la fonction des testicules. Dans la deuxième partie de ce travail nous avons suivi par l'UV et l'IR la migration de DEHP de PVC plastifié vers deux milieux simulants de denrées alimentaires, éthanol et éthanol eau. Les deux techniques ont révélé des taux de migration comparables dans le milieu éthanol (en moyenne 88 %). Dans l'éthanol 50 % l'UV a donné un taux de 22 % et l'IR a donné 66%. La méthode UV-visible présente un inconvénient lié à la réprécipitation de DEHP dans les milieux où il présente une faible solubilisation ; La spectrométrie FTIR est très intéressante pour le suivi de l'étude de migration car elle s'applique directement sur le matériau.

*Mots clés* : DEHP ; Toxicité ; Rat mâle ; dose ; développement ; PVC, Migration

### ملخص

الهدف من هذه الدراسة يتمثل في تقدير الاثار السمية للمادة الملينة للبلاستيك على الوظيفة التكاثرية و تطوير منهجية بسيطة و فعالة لمراقبة انتقال هذه المادة من مواد التغليف المصنوعة من PVC الى بعض السوائل ممثلي الاغذية. في الجزء الاول من هذا العمل قمنا بدراسة اثار التعرض للمادة الملينة للبلاستيك خلال فترة الحمل عند ذكر الفأر و النتائج اظهرت تخريب كبير في البنية و وظائف الخصية . من خلال الجزء الثاني من الدراسة استعملنا تقنية الاشعة فوق البنفسجية و فوق الحمراء لمراقبة انتقال المادة الملينة من شرائح PVC الى الاثانول و الاثانول المميح . التقنيتان كشفتنا على نتائج مماثلة: الاشعة فوق البنفسجية عندها جانب سيئ و هو تجمدالملين في المياه, تقنية الاشعة ما فوق الحمراء مهمة نظرا لاستعمالها المباشر للعينة.

### Abstract

The objective of this study consists in estimating the toxic effects for the reproduction and to set up a simple and relevant analytical methodology for followed by the migration of the DEHP of a in PVC plasticized towards some simulants circles of foodstuffs. In the first part of this work we studied the effect of *in utero* and lactational exposure to DEHP on the reproductive apparatus in male offspring ratst. Our results showed a significant deterioration of the morphology and function of testis; In the second part of this work we followed by the UV and the IR the migration of DEHP of PVC plasticized towards two simulants circles of foodstuffs, ethanol and ethanol water. Both techniques revealed comparable results of migration in the ethanol (88 %). In the ethanol 50 % the UV gave a 22 % and the IR gave 66 %. The UV-visible method presents an inconvenience related to the reprécipitation of DEHP in the circles where it presents a low solubilization; The spectrometry FTIR is very interesting for the follow-up of the study of migration because it applies directly to the material.

**Keywords:** DEHP; toxicity; Male offspring rats; Dose; Development; PVC, Migration

## *Liste des abréviations*

**AFSSA** : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

**ANSES**: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**ATSDR** : Agency for Toxic substances and Disease Registry

**CAS** (n°) : Chemical Abstract Services

**CE** : Commission Européenne

**CE** : Commission Européenne

**CIRC**: Centre International de Recherche sur le Cancer

**CLP**: Classification, Labelling and Packaging

**CMR** : Cancérogènes, Mutagènes et toxiques pour la Reproduction

**CPSC** : Consumer Product Safety Commission américaine

**DEHP** : Di-(2-ethylhexyl)phtalate

**DJT** : Dose Journalière Tolérable

**ECB** : European Chemicals Bureau

**ECHA**: European Chemicals Agency

**ECPI**: Conseil Européen des Plastifiants et Intermédiaires

**EFSA**: European food safety authority

**EINECS**: European Inventory of Existing Chemical Substances

**INERIS** : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

**INRS** : Institut National de Recherche et de Sécurité

**INSERM** : Institut National de la santé et de la recherche médicale

**IRTF**: Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier.

**ISO** : International Standardisation Organization

**LMG**: Limite de Migration Globale.

**LMS**: Limite de Migration Spécifique

**LOAEL**: Lowest Observable Adverse Effect Level

**MEHP**: mono-ethylhexylphtalate

**NOAEL** : No Observable Adverse Effect Level

**OCDE**: Organisation de coopération et de développement économiques.

**OFFEV**: Office fédéral de l'environnement

**OFSP**: Office fédéral de la santé publique

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PC** : Poids corporel

**PVC** : chlorure de polyvinyle

**PVC**: Polychlorure de Vinyle.

**REACH**: Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**RSE**: Réseau environnement santé

**THF** le tetrahydrofurane (ou 1,4-epoxybutane).

**UE** : Union Européenne

**UV** : Ultraviolet

---

---

**Liste des figures****Page**

<b>Figure 1</b> : Formule chimique générale du PVC .....	3
<b>Figure 2</b> : Structure chimique de base des phtalates .....	4
<b>Figure 3</b> : Photographie de la cavité abdominale d'un rat mâle montrant une partie des organes composant le système uro-génital .....	14
<b>Figure 4</b> : Schéma des compartiments tubulaires et interstitiels du testicule .....	17
<b>Figure 5</b> : Ontogenèse des deux fonctions testiculaires pendant la vie fœtale .....	17
<b>Figure 6</b> : Formule développée de DEHP .....	19
<b>Figure 6</b> : Effet d'une exposition au DEHP sur l'évolution pondérale des femelles parentes avant accouplement et pendant la gestation et la lactation .....	41
<b>Figure 7</b> : Effet d'une exposition <i>in utero</i> et pendant la lactation au DEHP sur les poids relatifs et absolus des testicules chez le rat mâle de 21JPN .....	44
<b>Figure 8</b> : Effet d'une exposition <i>in utero</i> et pendant la lactation au DEHP sur la distance anogénitale chez le rat mâle de 21JPN.....	45
<b>Figure 9</b> : Effet d'une exposition <i>in utero</i> et pendant la lactation au DEHP sur le taux de la testostérone chez le rat mâle nés de 21JPN .....	45
<b>Figure 10</b> : Structure histologique des testicules de rats témoins et traités par DEHP .....	46
<b>Figure 11</b> : Spectre IR de film de PVC pur et bandes d'absorption caractéristiques de la liaison C-Cl .....	47
<b>Figure 12</b> : Spectres IR du PVC pur et du PVC plastifié 30% DEHP avec les bandes caractéristiques de DEHP .....	48
<b>Figure 13</b> : Analyse de DEHP par UV-visible .....	49
<b>Figure 14</b> : Linéarité du DEHP dans les deux milieux simulants d'aliments .....	50
<b>Figure 15</b> : Cinétique de migration du DEHP par spectrométrie UV-visible.....	51
<b>Figure 16</b> : Diminution de la bande 1720 dans les films en PVC 30% DEHP dans l'éthanol absolu et éthanol 50 % .....	53
<b>Figure 17</b> : Cinétique de migration de DEHP dans les deux milieux éthanol absolu et éthanol 50% (2h/ 70°C).....	54
<b>Figure 18</b> : Diminution de la bande 1720 dans les films en PVC 30% DEHP dans l'éthanol absolu à 50°C pendant 10 jours.....	55
<b>Figure 19</b> : Cinétique de migration du DEHP (10J/50°C/Ethanol absolu) par FTIR. ....	56

<b>Tableau I</b> : Liste des simulants de denrées alimentaires .....	11
<b>Tableau II</b> : Classification réglementaire – explication .....	12
<b>Tableau III</b> : Classification de certains phtalates en tant que CMR .....	12
<b>Tableaux IV</b> : Identification du DEHP .....	19
<b>Tableau V</b> : Valeurs toxicologiques de référence connues pour le DEHP .....	24
<b>Tableau VI</b> : Effets d’une exposition foetale au DEHP sur les fonctions testiculaires néonatale de rat .....	27
<b>Tableau VII</b> : Effets d’une exposition foetale aux phtalates sur les différents types cellulaires du testicule foetal de rat .....	29
<b>Tableau VIII</b> : Protocole de l’étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération .....	34
<b>Tableau IX</b> : les simulants et leur affectation aux catégories de denrées alimentaires .....	37
<b>Tableau X</b> : Conditions d’essais de migration .....	38
<b>Tableau XII</b> : Etude préliminaire, résultats récapitulatifs.....	41
<b>Tableau XIII</b> : Effet d’une exposition <i>in utéro</i> et pendant la lactation sur les poids relatifs et absolus du foie et des reins chez le rat mâle de 21JPN .....	43
<b>Tableau XIV</b> : Identification des bandes IR d’absorption du plastifiant DEHP .....	48
<b>Tableau XV</b> : Résultats de migration obtenus par UV-visible dans les deux milieux .....	52
<b>Tableau XVI</b> : les pourcentages de migration obtenus par IRTF dans les deux milieux à 70°C/2h .....	54
<b>Tableau XVII</b> : les pourcentages de migration obtenus par IRTF dans le milieu éthanol absolu à 50°C/10J.....	56

## *Sommaire*

### *Introduction*

### ***PARTIE A : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE***

#### **Chapitre I : Généralités sur les emballages plastiques**

1.1. Définitions .....	1
1.2. Types de plastique .....	1
1.3. Principaux polymères thermoplastiques utilisés dans les emballages alimentaires .....	2
1.4. Les additifs .....	4
1.4.1. Les phtalates .....	4
1.5. Les interactions emballage/aliment .....	6
1.6. Fondements sur la migration polymère/aliment .....	7
1.7. Les facteurs d'influence sur la migration .....	8
1.8. Les techniques expérimentales utilisées .....	9
1.9. La réglementation sur les matériaux et les substances chimiques dans l'emballage plastique .....	9

#### **Chapitre II : L'appareil reproducteur mâle**

2.1. Généralités .....	14
2.2. Les testicules .....	14
2.3. Perturbations du développement testiculaire .....	18

#### **Chapitre III : Di (2-éthylhexyl) phtalate (DEHP)**

3.1. Propriétés physico-chimiques .....	20
3.2. La production de DEHP .....	20
3.3. Les principaux usages intentionnels du DEHP .....	20
3.4. Classification réglementaire .....	21
3.5. DEHP dans les emballages alimentaires .....	22
3.6. Exposition Humaine au DEHP .....	22
3.7. Toxicocinétique et métabolisme .....	25
3.8. Toxicité de DEHP sur l'organisme .....	26
3.8.1. Effets sur la fonction de reproduction .....	26
3.8.2. Toxicité aiguë .....	30

## **Sommaire**

---

3.8.3. Toxicité subchronique et chronique autre que reprotoxique .....	30
3.8.4. Cancérogénicité .....	31
3.8.5. Génotoxicité/ Mutagenicite .....	31
3.8.6. Tératogénicité .....	31
3.9. Mécanismes d'action cellulaires de DEHP dans le testicule.....	31

## ***PARTIE B : ETUDE EXPERIMENTALE***

### **Matériels et méthodes**

I. Matériels .....	33
1.1. Matériel chimique .....	33
1.2. Matériel biologique .....	33
II. Méthodologie expérimentale .....	34
2.1. Etude de la toxicité pour la reproduction .....	34
2.2. Etude de la migration du DEHP du PVC plastifié vers certains simulants de denrées alimentaires .....	37

### **Résultats**

I. Résultats de l'étude toxicologique .....	41
II. Résultats de l'étude de migration .....	47

### **Discussion**

I. Discussion des résultats de l'étude toxicologique .....	57
II. Discussion des résultats de l'étude de migration .....	64

*Conclusion et perspectives*

*Références bibliographiques*

*Annexes*

---

# *INTRODUCTION*

---

### *Introduction*

L'emballage plastique épouse le quotidien, sa multiplicité lui permet d'être présent dans tous les secteurs de l'industrie : de l'agro-alimentaire, de la cosmétique, de la santé, des produits d'entretien, des produits chimiques, du transport, de la distribution, des produits industriels et agricoles.

La production mondiale des matières plastiques a augmenté de 10 millions de tonnes (3,7 %) pour atteindre près de 280 millions de tonnes en 2011, conformément à un rythme de croissance que le secteur a connu depuis 1950 d'environ plus 9 % par an (**PlasticsEurop.org**, 2012).

Avec une consommation annuelle d'un million de tonnes, dont la moitié est importée d'Asie et d'Europe, le potentiel du marché algérien des plastiques est considérable. La consommation par tête se situe entre 8 et 10 kg (plastalger.com)

Le secteur des emballages est le plus gros consommateur de plastique ; plus de 50 % de toutes les marchandises en Europe sont emballées dans du plastique ; Ce matériau présente l'avantage d'être peu coûteux, plus léger, résistant aux chocs et facile à mettre en œuvre. Il est recyclable, ce qui permet d'éviter son amoncellement dans les décharges publiques.

Un des rôles essentiels de l'emballage est d'assurer une bonne protection du produit qu'il contient. Cependant, si l'emballage évite les pollutions, les contaminations extérieures que pourraient subir les produits emballés ; s'il permet de contribuer au maintien de la qualité et de la sécurité, il est rarement inerte. En effet plus de 5000 substances chimiques se caches derrière les emballages à des quantités qui peuvent être toxiques selon l'OFEV.

Plusieurs études ont démontré, chez l'Homme, une baisse de la production et de la qualité spermatique au cours du temps. En outre, l'incidence du cancer du testicule, qui est le cancer le plus fréquent chez l'homme jeune, a augmenté de façon régulière au cours des vingt dernières années.

Le di (2-ethylhexyl) phtalate (DEHP), est un plastifiant, il rend le plastique souple et flexible. Cette substance chimique officiellement classifiée comme toxique pour la reproduction et dit « poison migrant » n'est jamais liée chimiquement aux matières plastiques et migre ainsi facilement de l'emballage vers l'aliment.

Aisé à transformer et d'un excellent rapport qualité/prix, le DEHP demeure le plastifiant de référence pour de multiples applications du PVC souple malgré les restrictions réglementaires.

## *Introduction*

---

La mesure de la migration spécifique est une approche qui a été remise en question par plusieurs auteurs à cause des difficultés des procédures d'analyses.

L'objectif général de cette étude consiste à évaluer les effets toxiques pour la reproduction d'une exposition *in utero* et pendant la lactation au DEHP et de développer une méthodologie expérimentale simple et pertinente pour le suivi de la migration de cette substance de PVC plastifié vers les simulants de denrées alimentaires.

---

*PARTIE A*

*ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE*

---

## Chapitre I

### Généralités sur les emballages plastiques

#### 1.1. Définitions

**1.1.1. Emballage :** L'emballage est défini comme tout objet constitué de matériaux de toute nature, destiné à contenir et à protéger des marchandises données, allant des matières premières aux produits finis. Il permet leur manutention et leur acheminement du producteur au consommateur ou à l'utilisateur, et assure leur présentation (**Marcel**, 2002).

**1.1.2. Matières plastiques :** Les matériaux plastique, ou matériaux polymères, sont des matériaux constitués de macromolécules obtenues par polymérisation à partir d'un ou plusieurs motifs unitaires (**Gillet**, 2008).

**1.1.3. Polymère :** Selon la norme ISO 472 (Plastiques- Vocabulaire) la définition d'un polymère est : « Produit constitué de molécules caractérisées par un grand nombre de répétitions d'une ou de plusieurs espèces d'atomes ou de groupes d'atomes (motifs constitutionnels) reliés entre eux en quantité suffisante pour conduire à un ensemble de propriétés qui ne varient pratiquement pas avec l'addition ou l'élimination d'un seul ou d'un petit nombre de motifs constitutionnels. » (**REACH**, 2011). Les polymères sont des macromolécules constituées par un enchaînement répétitif de motifs élémentaires ou monomères (**Lezervant**, 2007).

**1.1.4. Monomère :** Selon la norme ISO 172 (Plastiques – Vocabulaire), un monomère est « Produit constitué de molécules dont chacune peut fournir un ou plusieurs motifs constitutionnels » selon (**REACH**, 2012). D'après **PlasticsEurop.org**, (2012) un monomère (du grec mono « une » et meros « partie ») est une petite molécule qui peut se lier chimiquement à d'autres monomères pour former un polymère.

#### 1.2. Types de plastique

Selon **REACH** (2011), on distingue deux (2) grands types de polymères selon leurs propriétés thermiques: Les thermodurcissables et les thermoplastiques.

##### 1.2.1. Les thermodurcissables

Les plastiques thermodurcissables sont transformés sous l'impact conjugué de la température, la pression et les produits chimiques. Les macromolécules réticulent pendant la cuisson. Cet état de la matière est irréversible, et donc les thermodurcissables ne peuvent être fondus de nouveau après leur réticulation. Ils restent solides et rigides presque jusqu'à la température de décomposition (**REACH**, 2011).

### **1.2.2. Les thermoplastiques**

Un polymère thermoplastique possède une structure chimiquement linéaire. Il est composé de chaînes macromoléculaires liées entre elles par des forces de cohésion. Les thermoplastiques peuvent être fondus à plusieurs reprises et sont capables soit de se dissoudre ou au moins d'être sensibles au gonflement sous l'action de nombreux solvants. Ils sont rigides à température ambiante, ramollissent avec l'augmentation de la température puis finalement deviennent fluides. Ils constituent la plus grande proportion de matières utilisées dans le monde (**REACH**, 2011).

### **1.3. Principaux polymères thermoplastiques utilisés dans les emballages alimentaires**

Les principales matières plastiques utilisées dans le marché d'emballage selon **PlasticsEurop.org** (2012) sont :

• le polyéthylène (PE) (29%) • le polypropylène (PP) (19%) • le polychlorure de vinyle (PVC) (11%) • le polyéthylène téréphtalate (PET) (6,5%) • le polystyrène (PS) (4,6%). Ces plastiques représentent près de 80 % de la demande totale de plastiques en Europe.

En Algérie on ne dispose pas de données suffisantes mais il semble que le PP et le PVC sont les principales matières utilisées, le PVC est destiné principalement à la fabrication des films (pour la biscuiterie) car il est plus hygiénique d'après **Amar Yahia** et al., (2007).

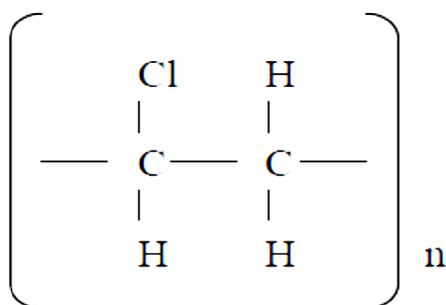
#### **1.3.1. Le polychlorure de vinyle (PVC)**

La production industrielle du PVC remonte au début des années 1930. C'est un plastique très présent dans notre vie quotidienne car l'ensemble de ses propriétés mécaniques et physiques et son aptitude à être modifié selon les besoins en font un matériau adapté à de multiples usages (**Hruska** et al., 2007).

Selon la commission Européenne (**CE**) (2005), le PVC est le 3ème polymère utilisé dans le monde après les polyéthylènes et les polypropylènes (20 % de la consommation mondiale totale des plastiques, soit de l'ordre de 28 millions de tonnes). **INERIS** (2006) indique qu'il est utilisé dans de nombreux secteurs industriels grâce à ses caractéristiques (résistance, isolation, légèreté, imperméabilité, durabilité, résistance mécanique, etc.). Il représente 11% de marché des emballages plastiques en Europe (**Mkacher**, 2012). Il semble que c'est le polymère principal utilisé en Algérie pour la fabrication des films alimentaires (**Amar Yahia** et al., 2007).

### 1.3.1.1. Fabrication de PVC

Le PVC est un polymère linéaire obtenu par polymérisation du monomère chlorure de vinyle



**Figure 1 : Formule chimique générale du PVC (INERIS 2006)**

Il est dérivé du sel (57 %) et du pétrole (43 %). Le PVC est fabriqué à partir de chlore et d'éthylène qui est obtenu à partir du pétrole, après plusieurs étapes, cela mène à la production d'un autre gaz, le chlorure de vinyle monomère (VCM). Ensuite, dans une autre réaction connue sous le nom de polymérisation, les molécules de VCM s'associent pour former une poudre blanche fine (le PVC). Cette poudre est mélangée avec des additifs (stabilisants et/ou plastifiants) pour obtenir les propriétés exactes nécessaires pour des applications spécifiques. Les granules (composites) ou poudres prêtes à l'emploi de PVC qui en résultent sont ensuite transformés en produit final (**PlasticsEurop.org**, 2013).

### 1.3.1.2. Les avantages de PVC

La combinaison des propriétés du PVC lui permet d'offrir des avantages en termes de performance qui sont difficiles à égaler. Ce matériau est durable et léger, solide, résistant au feu, avec d'excellentes propriétés d'isolation et une faible perméabilité, transparence, légèreté, bonne étirabilité, résistance au vieillissement...En faisant varier les additifs utilisés dans la fabrication des produits en PVC, les caractéristiques telles que la solidité, la rigidité, la couleur et la transparence peuvent être ajustées pour répondre à la plupart des applications dans le secteur d'emballages des produits alimentaires et de confiseries, d'eau et de jus de fruits (Bouteilles, barquettes, films étirables, boîtes alimentaires)(**PlasticsEurop.org**, 2013). La même source indique que le pvc est également largement utilisé dans :

- les produits pharmaceutiques
- les produits médicaux tels que les poches de sang, les tubes de transfusion et les gants chirurgicaux.
- les conduites, y compris les conduites et accessoires d'alimentation en eau et évacuation des eaux usées.

## 1.4. Les additifs

La fabrication des polymères et des emballages en plastiques nécessitent l'utilisation d'additifs (Mkacher, 2012). Les additifs sont ajoutés afin de faciliter sa mise en œuvre, de diminuer la fragilité du polymère, le rendre souple, et d'augmenter leur durée de vie (Zaki, 2008 ; Mkacher, 2012). Severin et al., (2011) indiquent que les additifs sont la source la plus importante de migrants potentiels en générant des néoformés parce qu'ils ne sont pas liés chimiquement à la chaîne polymérique. Les additifs du PVC sont principalement les plastifiants de type phtalate (Mkacher, 2012).

### 1.4.1. les phtalates

Selon l'office fédéral de la santé publique (OFSP) en 2013, les phtalates sont des plastifiants, ils rendent le plastique souple et flexible et sont utilisés dans de nombreux produits de la vie quotidienne, notamment les emballages.

Le nom « phtalate » dérive du terme « acide phtalique » lui-même dérivant du mot « naphthalène ». Les phtalates ressemblent à l'huile végétale pure, ont peu d'odeur et confèrent des caractéristiques appréciables aux emballages: flexibilité, durabilité, longévité et coût peu élevé. Produits pour la première fois dans les années 1920, ils ont connu un essor très important dans les années 1950, lorsque le PVC est apparu (INERIS, 2005).

Les phtalates ou esters phtaliques sont le produit d'estérification d'un acide phtalique avec un ou plusieurs alcools. (INSERM, 2011).

La structure des phtalates est la suivante :

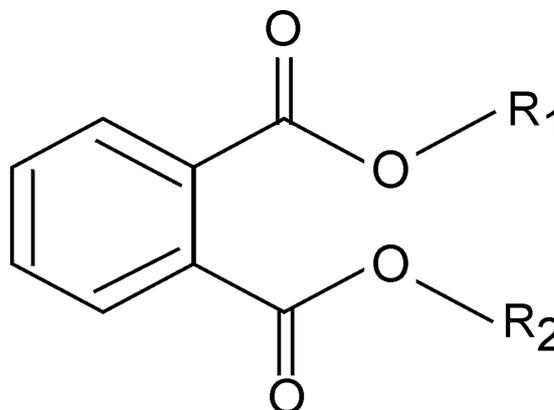


Figure 2 : Structure chimique de base des phtalates (INSERM 2011)

Selon Conseil Européen des Plastifiants et Intermédiaires (**ECPI**) (2012), les phtalates se divisent en deux sous groupes :

- Les phtalates à longue chaîne moléculaire ou « phtalates longs », comme le Diisononyl-phtalate (DINP) et le Diisodécyl-phtalate (DIDP), constituent plus de 80% des phtalates utilisés en Europe. Ces molécules ne sont pas classifiées comme substances à risque pour la santé ou l'environnement.
- Les phtalates dits à courte chaîne moléculaire ou « phtalates courts », tels que le Dibutyl-phtalate (DBP), le Butylbenzyl-phtalate (BBP), et le Di(2-éthylhexyl)-phtalate (DEHP), sont reconnus comme « substances extrêmement préoccupantes » par la réglementation européenne des substances chimiques (REACH) en raison de leurs effets sur la reproduction observés dans le cadre d'études menées sur des animaux.

### 1.4.1.1. Production et domaines d'utilisation

Globalement, approximativement six (6) millions de tonnes de plastifiants sont consommés chaque année, dont la consommation Européenne compte pour approximativement 1 million de tonnes (**plasticisers.org**, 2010). Le DEHP représente environ 50% de la production totale de phtalates (**Peijnenburg** et **Struijs**, 2006).

**OFSP** en 2012 indique que, les phtalates sont largement utilisés comme plastifiants (assouplissant et lubrifiant) du polychlorure de vinyle (PVC) (95% de leur consommation) et d'autres matières plastiques, ils leur confèrent la souplesse, l'extensibilité et l'élasticité voulues. Les domaines d'application les plus courants des phtalates sont les films plastiques, barquettes, bouteilles et boîtes alimentaires. Selon **INERIS** (2005) la majorité des articles en matières plastique rigides, semi-rigides ou souples contiennent des phtalates, la proportion pouvant atteindre 50 % dans certains produits, c'est par exemple le cas des films alimentaires. Toujours selon **INERIS** (2005) les phtalates sont également utilisés de manière restreinte (2 à 3 % de leur consommation) dans la composition d'autres types de polymères tels que les résines acétovinyliques, les esters de cellulose et le caoutchouc. **Lezervant** (2007) a signalé que les phtalates sont aussi utilisés dans le PS et PET.

#### 1.4.1.2. Caractéristiques physico-chimiques

**Almeras et al.**, ont indiqué en 2010 qu'à température ambiante, les phtalates sont des liquides organiques visqueux, huileux et transparents dont le point d'ébullition est élevé (> 250 °C). Ce sont des composés faiblement polaires, solubles dans les graisses et les alcools et très peu à non solubles dans l'eau, leur solubilité s'étendant de 1 g/L pour les plus lourds à quelques g/L pour les plus légers.

Selon L'OFSP en 2013, les phtalates sont dit des « poisons migrants », ils ne sont pas liés chimiquement aux matières plastiques, ils peuvent donc migrer facilement à partir des produits auxquels ils ont été ajoutés à différents stades : fabrication, transport, utilisation et enfin, lors de la dégradation et/ou du recyclage des produits finis, Ils se retrouvent alors dans les denrées alimentaires et l'eau potable.

### 1.5. Les interactions emballage/aliment

Un des rôles essentiels de l'emballage alimentaire est d'assurer une bonne protection du produit qu'il contient. Cependant, s'il évite les pollutions, les contaminations extérieures que pourraient subir les produits emballés ; s'il permet de contribuer au maintien de la qualité et de la sécurité, l'emballage est rarement inerte. L'interaction entre le contenant et le contenu peut aboutir à des transferts de matière. Ces phénomènes sont susceptibles d'altérer la qualité de l'aliment, de détériorer les propriétés mécaniques de l'emballage et de causer des problèmes toxicologiques (**Zaki**, 2008). **Bach Campa** (2011) indique trois types d'interactions possibles entre l'emballage et l'aliment : la perméation, la sorption et la migration.

**1.5.1. La perméation :** La perméation se caractérise par le transfert de gaz à travers l'emballage, notamment l'O<sub>2</sub> vers l'aliment, le CO<sub>2</sub> vers l'extérieur de l'emballage et le passage des composés volatils de l'extérieur vers l'aliment (**Severin et al.**, 2011)

**1.5.2. La sorption :** La sorption est l'assimilation des constituants de l'aliment par la paroi l'emballage plastique suivie de leur pénétration dans le polymère. Le processus de sorption peut induire une perte des arômes de l'aliment et entraîner une modification structurale du polymère (**Severin et al.**, 2011).

**1.5.3. La migration :** La migration des constituants de l'emballage (monomères résiduels, additifs, etc.) vers le produit conditionné est un autre type d'échange de matière qui constitue un problème de sécurité alimentaire (**Bach Campa**, 2011). Dans la présente étude, nous allons nous intéresser à ce phénomène pour l'additif di (2-ethylhexyle) phtalate (DEHP) utilisé comme plastifiant dans les emballages en PVC plastifié.

## 1.6. Fondements sur la migration polymère/aliment

La migration peut se définir comme le transfert de matière d'une source externe vers l'aliment. De façon générale, ce transfert de matière peut se produire pendant la production, le transport, le stockage, la cuisson ou même pendant la consommation de l'aliment (**Simoneau**, 2008). Selon **Lau** et **Wong** (2000), le processus de migration de l'emballage polymérique vers le produit fini peut être décrit en trois étapes étroitement liées entre elles. Ces étapes selon les auteurs sont les suivantes :

### 1.6.1. Diffusion du migrant à travers le polymère

Le coefficient de diffusion (D) représente la vitesse de migration d'une substance à travers chaque phase. La migration des substances dans les systèmes polymère/aliment peut être modélisée par la loi de Fick suivant l'équation :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left( D \frac{\partial C}{\partial x} \right)$$

Où C est la concentration du composé diffusant, x est la position dans le matériau et t est le temps

### 1.6.2. Solvatation dans l'interface polymère / aliment

Le coefficient de partage est l'équilibre thermodynamique entre les deux phases aliment /polymère. Le coefficient de partage (K) de chaque migrant est défini par le ratio entre la concentration en équilibre dans le polymère (C<sub>p</sub>) et dans l'aliment (C<sub>s</sub>), représenté par l'équation :

$$K = \frac{C_p}{C_s}$$

### 1.6.3. La dispersion de la molécule diffusante

Selon **Lau** et **Wong** (2000), au-delà de l'interface du polymère, les molécules se dispersent dans l'aliment au hasard. Le fait de mélanger ou agiter le produit conditionné pourrait accélérer la cinétique de décrochement des composés de la surface du matériau plastique. Cependant, les principaux facteurs qui affectent la dispersion sont la solubilité du migrant envers l'aliment et le coefficient de diffusion de chaque molécule.

## 1.7. Les facteurs d'influence sur la migration

Il existe des facteurs internes et des facteurs externes qui ont un effet direct sur la diffusivité des molécules présentes dans l'emballage. Les facteurs internes font référence à des propriétés inhérentes des molécules diffusantes et aux matériaux tels que la nature chimique des substances (monomères, additifs) présentes dans les matières plastiques ainsi que l'état structural et la morphologie du polymère. Le contact avec l'aliment (composition et propriétés chimiques) et les conditions d'exposition ou d'usage du matériau sont des éléments externes influençant la diffusivité (**Bach Campa**, 2011).

### 1.7.1. La nature des constituants du polymère

De façon générale, toutes les substances entrant dans la composition (monomères, catalyseurs, additifs, etc.) des matières plastiques sont susceptibles de migrer. Les additifs (stabilisants et adjuvants technologiques), utilisés pour donner des propriétés spécifiques au produit final, ne sont pas liés à la chaîne polymérique par des liaisons fortes et leur risque de migration est plus élevé (**Zaki**, 2008 et **Bach Campa**, 2011).

### 1.7.2. La nature et l'état du polymère

Le coefficient de diffusion évolue d'une façon plus importante en fonction de la nature et de l'état des polymères. La diffusion dans les polymères à l'état caoutchouteux, comme le PVC plastifié, est plus rapide que pour les polymères à l'état vitreux et semi-cristallin (PET, PVC, PA). (**Pennarun**, 2001; **AFSSA**, 2006).

### 1.7.3. Le milieu au contact

Le caractère lipophile ou hydrophile du migrant va déterminer sa capacité à diffuser vers l'aliment. Les monomères, stabilisants et les additifs sont habituellement des molécules lipophiles. Même si leur diffusion est possible dans les aliments aqueux, ils migrent davantage dans les aliments gras (**Feigenbaum et al.**, 1993).

### 1.7.4. La température

Les phénomènes de diffusion d'une molécule dans un polymère, d'après **Zaki** (2008), suivent un processus d'activation de type Arrhénius, la vitesse de diffusion est fonction de la température selon la relation :

$$D = D_0 \cdot \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)$$

Où  $T$  est la température en Kelvin,  $E_a$  est l'énergie d'activation en  $J.mol^{-1}$  et  $R$  est la constante des gaz parfaits ( $R = 8,314 J.mol^{-1}.K^{-1}$ ).

Le facteur pré-exponentiel  $D_0$  représente le coefficient de diffusion pour une température infinie.

### **1.8. Les techniques expérimentales utilisées**

Plusieurs techniques expérimentales sont utilisées pour étudier les polymères et les phénomènes de transport dans les polymères : la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la spectroscopie ultraviolet (UV) et les techniques chromatographiques (Zaki, 2008). La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été largement étudiée. Riquet et al., (1998) l'ont utilisée pour étudier la sorption de l'huile d'olive dans le polypropylène et déterminer les profils de concentration dans l'épaisseur des films. Safa et al.,(2002) l'ont largement exploitée dans leurs travaux pour étudier les cinétiques de sorption d'esters dans des films ou des flacons de polypropylène. Bach Campa (2011) l'a utilisée pour suivre la migration dans le PET et Mkacher (2012) a utilisé la FTIR et la spectroscopie ultraviolet pour suivre le vieillissement de PVC.

### **1.9. La réglementation sur les matériaux et les substances chimiques dans l'emballage plastique**

#### **1.9.1. Règlement No. 10/2011 de la Commission Européenne sur les matériaux**

Depuis le 1 avril de 2011, l'aptitude des matériaux à entrer en contact avec les aliments est régie par le règlement (EU) N° 10/2011 publié au Journal Officiel de la Commission Européenne le 14 janvier. (<http://www.contactalimentaire.com>).

Le règlement européen n°10/2011 de la Commission Européenne "concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires" établit "des exigences spécifiques applicables à la fabrication et à la commercialisation de matériaux et d'objets en matière plastique qui sont destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires, qui sont déjà en contact avec des denrées alimentaires ou dont on peut raisonnablement prévoir qu'ils entreront en contact avec des denrées alimentaires". Le texte couvre tous les plastiques. La liste des substances autorisées a été complétée pour constituer une liste exhaustive pour les monomères et les additifs (liste positive). Détaillés dans l'annexe III, les simulants de denrées alimentaires ont également évolué, tout comme les modalités des essais de migration (annexe V). ([industrie.com](http://industrie.com))

Le règlement envisage deux notions de migrations :

- **La migration globale**, qui n'évalue que la masse globale de migrants perdus par l'emballage, sans distinguer la nature et la spécificité de ces migrants. La «limite de migration globale» (**LMG**), est la quantité maximale autorisée de substances non volatiles cédées par un matériau ou objet aux simulants de denrées alimentaires;
- **Les migrants spécifiques** qui, au contraire, s'efforcent de qualifier et d'identifier chacun de ces éléments. La «limite de migration spécifique» (**LMS**), la quantité maximale autorisée d'une substance donnée cédée par un matériau ou objet aux denrées alimentaires ou aux simulants de denrées alimentaires;

**Bach Campa**, (2011) indique que la LMS est basée sur des critères toxicologiques et peut s'exprimer en mg de migrant / kg d'aliment ou bien en mg de migrant / dm<sup>2</sup> de matériau. Cette limite est liée à la dose journalière tolérable (DJT) calculée selon la relation:

$LMS \text{ (mg/kg aliment)} = 60 \times DJT \text{ (mg/kg poids corporel/jour)}$  ou  $LMS \text{ (mg/kg)} = 6 \times LMS \text{ (mg/dm}^2)$  ou  $LMS \text{ (mg/dm}^2) = 10 DJT$ . Le règlement CE n°10/2011 a fixé certaines restrictions d'utilisation et des LMS pour certains phtalate :

- Le BBP : Matériaux et objets réutilisables ; matériaux et objets à usage unique en contact avec des aliments non gras à l'exception des préparations pour nourrissons ; Auxiliaire technologique à des concentrations  $\leq 0,1\%$  dans le produit final ; LMS = 30mg/kg simulant de denrée alimentaire),
- Le DEHP : Matériaux et objets réutilisables en contact avec des aliments non gras ; Auxiliaire technologique à des concentrations  $\leq 0,1\%$  dans le produit final ; LMS = 1,5 mg/kg simulant de denrée alimentaire,
- Le DBP : Matériaux et objets réutilisables en contact avec des aliments non gras ; Auxiliaire technologique à des concentrations  $\leq 0,05\%$  dans le produit final ; LMS = 0,3mg/kg).

La mesure de la migration spécifique, en particulier avec un aliment donné, est une approche qui a été remise en question par plusieurs auteurs à cause des difficultés des procédures d'analyses. Pour y pallier, plusieurs liquides simulateurs d'aliments ont été utilisés pour étudier le phénomène (**Bach Campa**, 2011).

- «**Simulant de denrée alimentaire**», est un milieu d'essai qui imite une denrée alimentaire et qui, par son comportement, reproduit la migration à partir des matériaux destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires; (**règlement**, 2011)

**Tableau I : Liste des simulants de denrées alimentaires**

Simulant de denrée alimentaire	Abréviation
Ethanol à 10 % (v/v)	Simulant A
Acide acétique à 3% (m/v)	Simulant B
Ethanol à 20%	Simulant C
Ethanol à 50 %	Simulant D1
Huile végétale ou Ethanol absolu	Simulant D2
Oxyde de poly(2,6-diphényl-p-phénylène	Simulant E

#### ❖ Affectation générale des simulants aux denrées alimentaires

Les simulants A, B et C sont affectés aux denrées alimentaires à caractère hydrophile qui peuvent extraire des substances hydrophiles. Le simulant B est utilisé pour les denrées alimentaires dont le pH est inférieur à 4,5. Le simulant C est utilisé pour les denrées alimentaires alcooliques ayant une teneur en alcool de 20 % maximum et les denrées alimentaires contenant une quantité significative d'ingrédients organiques qui les rendent davantage lipophiles.

Les simulants D1 et D2 sont affectés aux denrées alimentaires à caractère lipophile qui peuvent extraire des substances lipophiles. Le simulant D1 est utilisé pour les denrées alimentaires alcooliques ayant une teneur en alcool supérieure à 20 % et pour l'huile dans les émulsions aqueuses. Le simulant D2 est utilisé pour les denrées alimentaires contenant des matières grasses libres en surface.

Le simulant E est affecté aux essais de migration spécifique dans des denrées alimentaires sèches.

#### 1.9.2. Règlement (CE) N° 1272/2008 (CLP) (selon le RES, 2012)

La réglementation concernant le classement des substances chimiques est issue de la **directive 67/548/CEE**, remplacée depuis le 20 janvier 2009 par le **règlement (CE) n° 1272/2008**, appelé règlement **CLP** (**C**lassification, **L**abelling and **P**ackaging) relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges.

Le présent règlement complète le système **REACH** (*Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals*) pour l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques introduit en 2007.

L'Agence Européenne des Produits Chimiques (**ECHA**) (*European Chemicals Agency*) effectue les propositions de classement « liste des candidats » à la Commission européenne pour l'autorisation sous REACH.

La classification CMR (cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction) prévoit trois niveaux de risque par agent :

**Tableau II : Classification réglementaire – explication**

Comparatif de la classification des substances CMR par catégorie/Date		
	Directive 67/548 CE (France : arrêté du 20 avril 2004)	Règlement CLP (obligatoire à partir du 01/12/2010 pour les substances et du 01/06/2015 pour les mélanges)
avéré pour l'homme	1	1A
Avéré pour l'animal et suspecté pour l'homme	2	1B
suspect-doute en l'absence d'informations sérieuses disponibles	3	2

**Tableau III : Classification de certains phtalates en tant que CMR (critères CLP)**

Identification chimique internationale	Numéros CAS	Classification
dibutyl phthalate (DBP)	84-74-2	Repro. 1B
benzyl butyl phthalate (BBP)	85-68-7	Repro. 1B

Selon **Europa.eu** (2011), depuis février 2011, l'Europe a décidé d'interdire le DEHP, le DBP et le BBP d'ici 2014-2015. Ces substances chimiques seront interdites dans l'Union Européenne conformément à l'alerte REACH, sauf pour les entreprises ayant obtenu une autorisation individuelle d'utilisation ; ils devront prouver que les mesures de sécurité requises ont été prises pour contrôler efficacement les risques, ou que les avantages pour l'économie ou la société l'emportent sur les risques, et ce quelle que soit la quantité de substances.

### **1.9.3. Réglementation Algérienne, le décret exécutif n° 91-04**

**le décret exécutif n° 91-04** du 19 janvier 1991 relatif aux matériaux destinés à être mis en contact avec les denrées alimentaires et les produits de nettoyage de ces matériaux, est le seul règlement qui existe concernant les matériaux destinés à entrer en *contact* avec les denrées alimentaires , il précise dans l'article 05 que « les matériaux destinés à être mis en contact avec les denrées alimentaires doivent être élaborés exclusivement avec des constituants ne présentant aucun risque d'atteinte à la santé du consommateur »

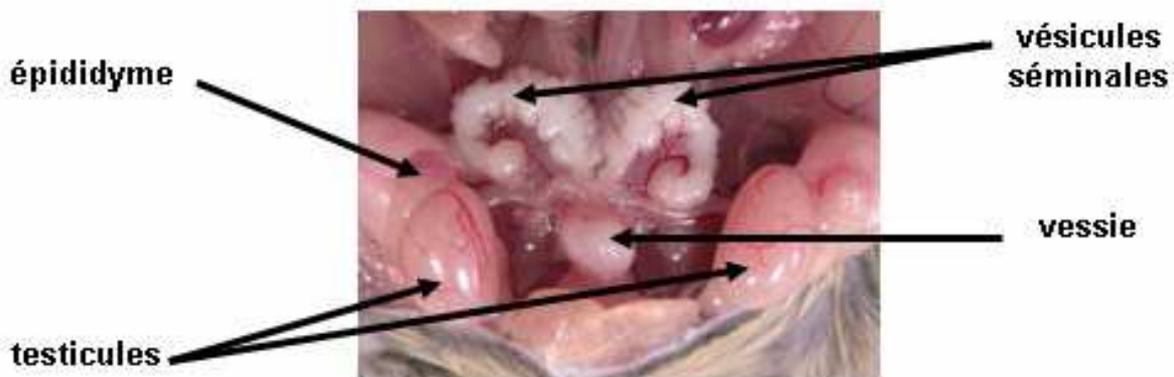
Le mot « phtalates » ne figure pas dans la réglementation Algérienne , il ne fait pas encore l'objet d'une réglementation spécifique, mais on peut l'inclure dans l'article 07 de **la Loi n° 09-03** du 25 février 2009 relative à la protection du consommateur et à la répression des fraudes, qui stipule que « Les équipements, matériels, outillages, emballages et autres instruments destinés à être mis en contact avec les denrées alimentaires, doivent être composés exclusivement de matériaux ne pouvant pas altérer ces denrées. »

## Chapitre II

### L'appareil reproducteur mâle

#### 2.1. Généralités

L'appareil reproducteur mâle est formé par l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme. Il comprend deux gonades (testicules), un système de conduction (tubes droits et *rete testis*, canaux ou cônes efférents, épидидyme, canal déférent, canal éjaculateur) qui assurent le transport des spermatozoïdes et des glandes accessoires (vésicules séminales, prostate et glandes de Cowper) qui sécrètent le liquide de transport et de nutrition des spermatozoïdes, constituant le sperme. (Haschek et al., 1998; Creasy et al., 2002; Friry-Santini, 2007)



**Figure 3: Photographie de la cavité abdominale d'un rat mâle montrant une partie des organes composant le système uro-génital.** (D'après Thèse de Sophie Ludwig, PARIS-SUD 11, 2011)

Les testicules, les épидидymes, les vésicules séminales et la prostate sont des organes dits hormono-dépendants. Ceci signifie que leur développement et leurs fonctions sont contrôlés de manière étroite par les hormones, principalement les androgènes et les œstrogènes (Ludwig, 2011).

#### 2.2. Les testicules

Les testicules sont deux organes pairs ovoïdes, chacun logé dans une poche revêtue d'une peau appelée scrotum (Friry-Santini, 2007). Ludwig (2011) indique que le scrotum a pour fonction de maintenir les testicules à une température inférieure de 2 °C à celle du reste du corps, condition indispensable pour permettre la production des spermatozoïdes.

### 2.2.1. Physiologie et fonctions du testicule

Le testicule, d'après **Rouiller-Fabre et al.**, (2008), assure deux grandes fonctions : la gamétogenèse et la stéroïdogénèse.

- La gamétogenèse correspond à la mise en place et au développement des cellules germinales pendant la vie fœtale et néonatale et à la spermatogenèse qui s'instaure après la puberté et aboutit à la production de spermatozoïdes.
- La stéroïdogénèse correspond, quant à elle, à la synthèse et à la sécrétion des hormones stéroïdes, la principale étant la testostérone. Cette hormone est responsable de la masculinisation chez le fœtus et de l'établissement et du maintien des caractères sexuels secondaires mâles et de la spermatogenèse chez l'adulte.

Les mêmes auteurs indiquent que cette double fonction correspond à une organisation anatomique en deux compartiments fonctionnels :

- Le tissu interstitiel, conjonctif vascularisé (sépare les tubes séminifères), contenant les cellules de Leydig responsables de la production de testostérone ;
- Les tubes séminifères, de nature épithéliale, avasculaires, contenant les cellules germinales et les cellules de Sertoli qui servent de support à la spermatogenèse.

Ces deux fonctions s'établissent durant la vie fœtale et cette ontogenèse est fondamentale puisque du nombre et de la qualité des cellules germinales qui se mettent en place pendant la période fœtale dépend, en partie, la fertilité de l'individu à l'âge adulte (**Orth et al.**, 1988 et **Lu et al.**, 2003). **Jost et al.**, ont indiqué en 1973 que c'est la production de la testostérone qui assure la masculinisation des organes génitaux internes et externes.

### 2.2.2. Les cellules du testicule

#### 2.2.2.1. Les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli sont les premières cellules à se différencier au sein de la gonade. Pendant la vie fœtale et périnatale, le nombre de cellules de Sertoli augmente fortement en raison d'une prolifération active de ces cellules (**Muczynski**, 2011).

Les cellules de Sertoli jouent un rôle fondamental dans la survie des cellules germinales. au cours de la vie fœtale, la cellule de Sertoli sert de support au développement des cellules germinales ainsi qu'à leur différenciation (**Sharpe et al.**, 1999). **Muczynski**, (2011) indique qu'un développement correct des cellules de Sertoli est, par voie de fait, un critère essentiel au développement des cellules germinales ainsi qu'à la fonction de reproduction de l'individu adulte.

### **2.2.2.2. Les cellules de Leydig**

Les cellules de Leydig sont les cellules majoritaires de l'interstitium chez le rat. Elles représentent moins de 5 % des cellules du testicule (**Friry-Santini**, 2007). **Muczynski**, (2011) indique que les cellules de Leydig fœtales sont responsables de la production des androgènes nécessaires à la masculinisation du fœtus ainsi qu'à la descente testiculaire sous l'action de la testostérone.

- **Rôle de la testostérone :**

La testostérone est une hormone multifonctionnelle selon **Friry-Santini**, (2007). Elle permet, selon le même auteur, la différenciation, la croissance et le fonctionnement des organes reproducteurs; elle est responsable des caractères sexuels secondaires masculins (pilosité, mue de la voix, musculature, pulsions sexuelles et comportement agressif) et elle joue un rôle essentiel au cours de l'embryogenèse. **Ludwig**, (2011) indique que la production de testostérone au cours de la vie fœtale est responsable de la masculinisation du tractus génital et notamment la descente testiculaire.

### **2.2.2.3. Les cellules germinales**

Les cellules germinales fœtales (gonocytes) sont un type cellulaire qui prolifère activement afin de constituer le stock de spermatogonies souches nécessaire à la fertilité de l'individu adulte (**Muczynski**, 2011). Les cellules de la lignée germinale subissent deux grandes phases de développement. La première de ces phases a lieu au cours de la vie fœtale et néonatale et permet la transition de la cellule germinale primordiale vers la spermatogonie. La deuxième phase, quant à elle, a lieu au moment de la puberté et représente le cycle de la spermatogénèse qui, à partir de la spermatogonie, produira le pool de spermatozoïdes (**Culty**, 2009).

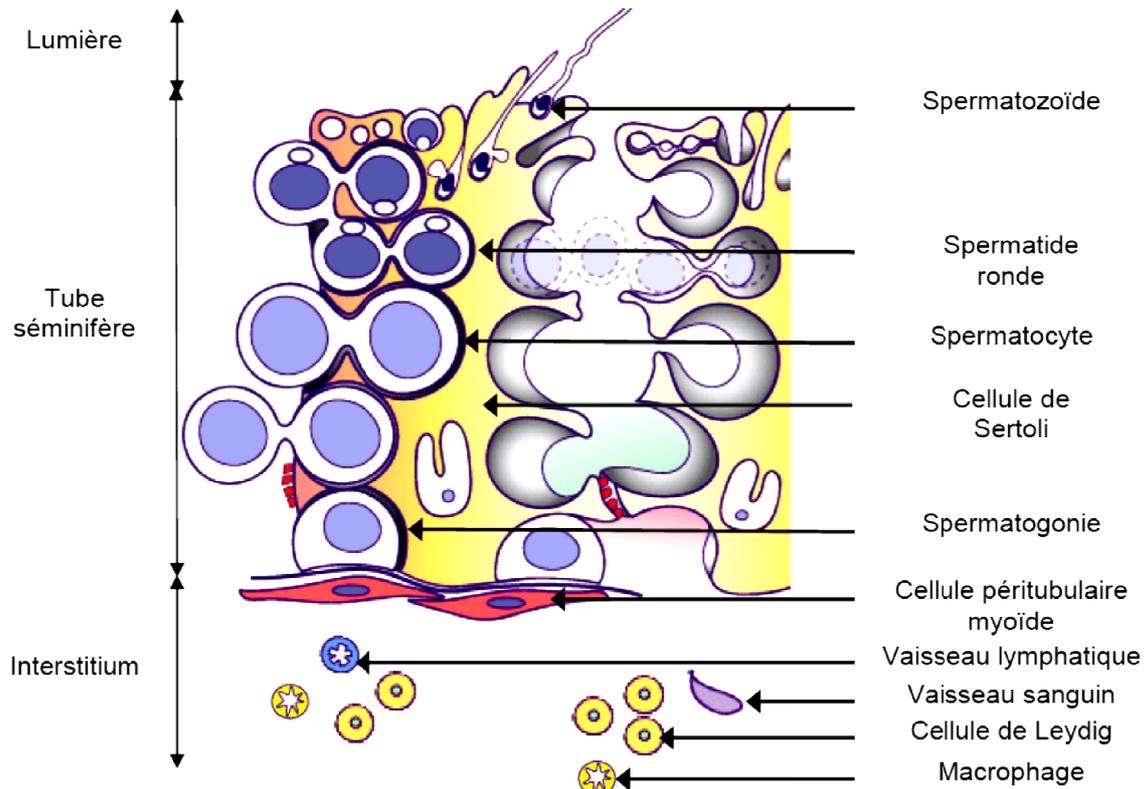


Figure 4: Schéma des compartiments tubulaires et interstitiels du testicule

**STEROIDOGENESE**

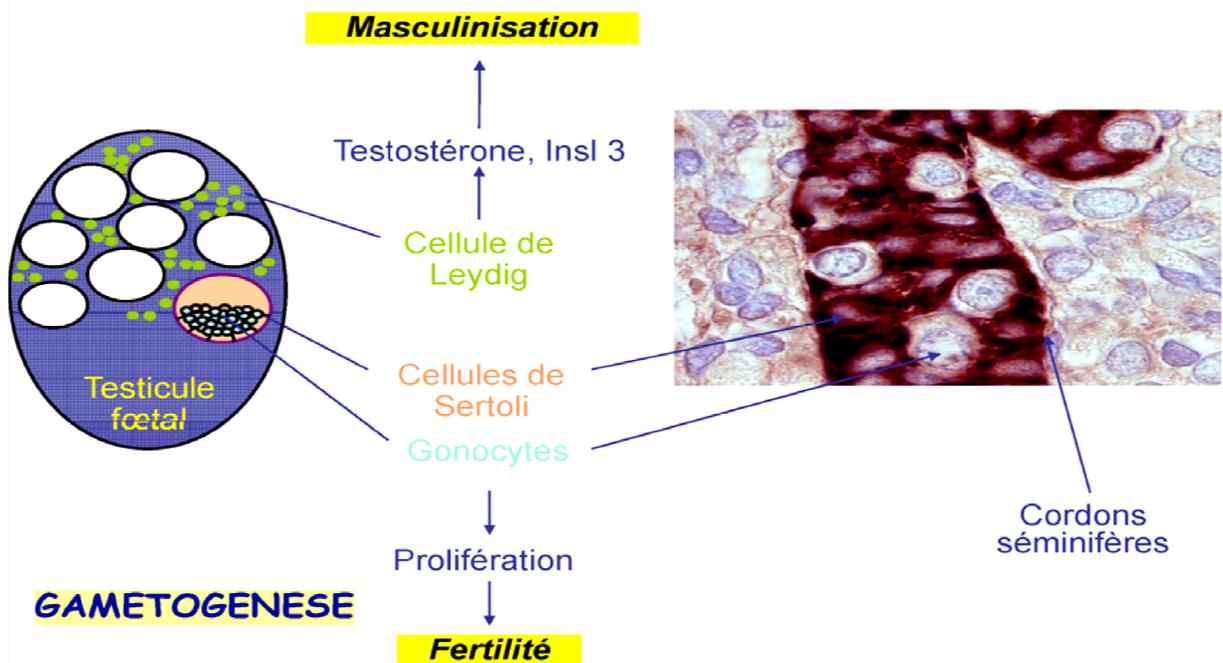


Figure 5 : Ontogenèse des deux fonctions testiculaires pendant la vie fœtale (Rouiller-Fabre et al., 2008).

### **2.3. Perturbations du développement testiculaire**

Au cours des dernières décennies, les inquiétudes vis-à-vis des changements survenus dans l'environnement et de leurs conséquences possibles sur la fonction de reproduction masculine se sont amplifiées (**Delbes et al.**, 2006 ; **Slama et al.**, 2006). **Sharpe** a indiqué en 2006 que plusieurs études ont démontré, chez l'Homme, une baisse de la production et de la qualité spermatique au cours du temps. En outre, l'incidence du cancer du testicule, qui est le cancer le plus fréquent chez l'homme jeune, a augmenté de façon régulière au cours des vingt dernières années dans tous les pays où des études ont été réalisées (**Rouiller-Fabre et al.**, 2008). **Toppari et al.**, ont rapporté en 2001 une augmentation de l'incidence de deux anomalies congénitales des organes génitaux externes : la cryptorchidie et l'hypospadias.

En 1993, **Sharpe et Skakkebaek** ont émis l'hypothèse selon laquelle ces différentes altérations pourraient représenter différentes manifestations d'une même entité pathologique, le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS), syndrome qui aurait pour origine une altération du développement du testicule pendant la vie fœtale. Ces troubles résulteraient selon **Sharpe et Skakkebaek**, (1993) des effets délétères de polluants chimiques, de plus en plus variés et concentrés dans l'environnement, qui agiraient comme des perturbateurs endocriniens (PE). Les principaux polluants incriminés, d'après les mêmes auteurs sont des composés à activité oestrogénique ou antiandrogénique qui, de par leur nature, peuvent dérégler la balance oestrogène/androgène en jouant sur la quantité, la production et/ou l'action de ces hormones chez le mâle et, ainsi, perturber le développement testiculaire.

En 2008, **Rouiller-Fabre et al.**, ont constaté qu'un certain nombre d'arguments sont en faveur d'un effet délétère d'une famille de perturbateurs endocriniens, les phtalates, sur la fonction de reproduction masculine. Les mêmes auteurs indiquent que des études récentes ont établi des corrélations entre le développement du testicule fœtal et la reprotoxicité des phtalates, aux concentrations environnementales. Ainsi, **Swan et al.**, ont rapporté en 2005 des corrélations entre des niveaux élevés de phtalates dans les urines de la mère pendant la grossesse et une réduction de la masculinisation de l'enfant à la naissance, de même qu'entre les concentrations de phtalates dans le lait maternel des premiers jours post-partum et différents indicateurs de la fonction des testicules des nourrissons. En 2006, **Latini et al.**, ont indiqué que le phtalate le plus important retrouvé dans l'environnement et qui est officiellement classifié comme toxique pour la reproduction est le DEHP.

## Chapitre III

## Di (2-éthylhexyl) phtalate (DEHP)

Le DEHP connu aussi sous le nom de dioctylphtalate (DOP), est un ester ramifié de la famille des phtalates. Il a pour formule chimique  $C_{24}H_{38}O_4$  et pour numéro CAS 117-81-7 (INERIS, 2005).

Le DEHP est reconnu pour être un perturbateur endocrinien par les différentes autorités mondiales (OMS, 2012 ; EFSA, 2013 ; OFEV, 2013).

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit un perturbateur endocrinien comme suit: « une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant de ce fait des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou au niveau des (sous-)populations ». (Selon ANSES, 2013 et EFSA 2013).

La formule développée de DEHP est la suivante :

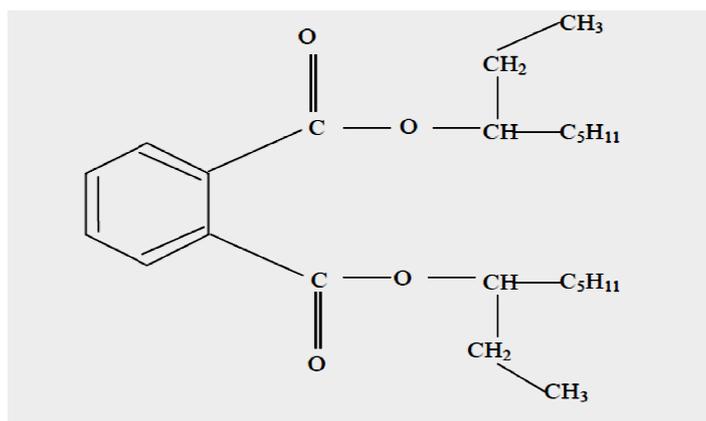


Figure 6 : Formule développée de DEHP

## Tableaux IV : Identification du DEHP

Numéro	CAS : N° 117-81-7 EINECS : N° 204-211-0
Nom	Phtalate de bis (2-éthylhexyle)
Synonymes	Phtalate de di (2-éthylhexyle) (DEHP) Phtalate de di-sec-octyle (DOP)
Formule brute	$C_{24}H_{38}O_4$

### 3.1. Propriétés physico-chimiques

Forme physique	Liquide huileux très peu volatil, presque incolore, odeur très faible (INRS, 2004)
Poids moléculaire	390,57 g.mol <sup>-1</sup> (INRS, 2004)
Point d'ébullition	384°C (ECB, 2008)
Point de fusion	-47°C (ECB, 2008)
Pression de vapeur	3,4.10 <sup>-5</sup> Pa (20°C) (ECB, 2008)
Densité	0,984 g/ml à 20°C (ECB, 2008)
Solubilité	Pratiquement insoluble dans l'eau (41 ug/l à 25°C), soluble dans les solvants organiques (ECB, 2008)
Point d'éclair	196°C (ECB, 2008)

### 3.2. La production de DEHP

Selon l'INRS (2013), le DEHP a eu ces 50 dernières années une importance économique considérable au regard des quantités produites. La production mondiale a atteint 2 millions de tonnes (t) en 2002 puis sa consommation a diminué notablement dans l'union européenne. Ainsi de 595 000 t produite en 1997 cette quantité est passée à 340 000 t en 2007 et serait inférieure à 100 000 t actuellement.

Très apprécié pour les propriétés mécaniques qu'il confère au PVC et pour la facilité de sa transformation, il présente un très bon rapport qualité prix. Il est considéré depuis plus d'une trentaine d'années comme le produit standard du marché des plastifiants (ECPI, 2012).

### 3.3. Les principaux usages intentionnels du DEHP

L'INERIS a identifié en 2010, trois (3) principales applications du DEHP en Europe :

- Plastifiant du PVC (~95%) : Plus de 95 % du DEHP consommé est employé comme plastifiant dans l'industrie des polymères, et plus particulièrement dans la production de produits en PVC souple (emballages alimentaires, fil électrique, revêtement de sol, isolation), appareils médicaux, jouets et cuirs synthétiques ;
- Plastifiant de polymère non-PVC (résines vinyliques, esters cellulosiques, caoutchoucs) (~2%) : agent anti-mousseux dans la production de papier, émulsifiant pour cosmétique, parfums et pesticides ;
- Usage Non-polymère (~3%) : peintures, encre et enduits d'étanchéité.

Plusieurs auteurs rapportent l'utilisation de DEHP comme plastifiant dans :

- Le polyéthylène téréphtalate (PET), (**Casajuana et Lacorte**, 2003; **Biscardi et al.**, 2003 **Fankhauser-Noti et Grob**, 2006; **Montuori et al.**, 2008 ; **Marie-Hélène**, 2013). En effet les auteurs ont signalé la présence quasisystematique de DEHP dans les eaux embouteillée en PET à des concentrations très variables suivant les études (**Biscardi et al.**, 2003 ; **Dargnat**, 2008 ; **Senthil et Ligy**, 2009 ; **Bach Campa**, 2011 ; **Marie-Hélène**, 2013). Il est largement utilisé en Algérie plus spécialement pour les corps gras et conditionnements des eaux.
- Le polyuréthane le substitut de PVC pour les produits pharmaceutiques (**Bergé**, 2012).

### 3.4. Classification réglementaire (Selon ANSES 2012)

Mutagène	-UE : non classé
Cancérogène	-UE : non classé -IARC : <b>groupe 2B</b> , l'agent cancérogène possible pour l'Homme (2011) -EPA : <b>groupe B2</b> , l'agent est supposé cancérogène pour l'Homme (1988)
Toxique pour la reproduction	- <b>Directive 67/548 CE: cat 2</b> : substance devant être assimilées à des substances altérant la fertilité humaine (phrase de risque R60 : peut altérer la fertilité) et substance devant être assimilées à des substances causant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine (phrase de risque R61 : risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant) (1996) - <b>CLP : Cat 1B</b> : Substances présumées toxiques pour la reproduction humaine (phrase de risque H360FD : peut nuire à la fertilité peut nuire au fœtus (2008).
Pictogramme selon le règlement CLP	
	

### 3.5. DEHP dans les emballages alimentaires

Le règlement **CE n°10/2011** a interdit le DEHP dans les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires grasses et fixe une LMS de 1,5 mg/kg simulant de denrée alimentaire pour le contact avec les aliments non gras, avec utilisation comme auxiliaire technologique à des concentrations  $\leq 0,1\%$ .

Le DEHP a été inscrit sur la liste des substances prioritaires à entrer sur la « liste des candidats » pour l'autorisation sous REACH publiée le 28 octobre 2008 par l'ECHA (**Bergé, 2012**).

### 3.6. Exposition Humaine au DEHP

Selon le rapport d'expertise « reproduction et environnement » de l'**INSERM** 2011, l'exposition humaine au DEHP est importante et croît régulièrement en raison de la très large utilisation de ce composé et de l'augmentation des niveaux de production au cours des trente dernières années.

La particularité des phtalates utilisés en plasturgie tient au fait qu'ils ne sont pas liés de manière covalente aux polymères auxquels ils confèrent leur souplesse. Ils peuvent donc facilement migrer dans les matériaux d'emballages et être relargués dans le milieu environnant, en particulier lorsque les plastiques qui en contiennent sont soumis à des températures élevées (**INSERM, 2011 ; OFEV, 2011**).

#### 3.6.1. Source d'exposition

L'ingestion d'aliments ayant été en contact avec des emballages contenant de DEHP demeure la principale source d'exposition pour la population générale (**Dagnat, 2008 ; INRS, 2010 ; Muczynski, 2011 ; INSERM 2011 ; ANSES, 2012 ; OFSP, 2012 et 2013 ; Heinemeyer, 2013**).

**Dagnat** en 2008, indique que le DEHP a tendance à se concentrer dans les aliments les plus gras tels que le beurre, le lait ou le fromage, mais aussi dans la viande en raison de sa solubilité dans les corps gras.

D'après **Heudorf et al.**, (2007), plusieurs études ont montré la présence des phtalates dans divers produits alimentaires ainsi que dans l'eau de bouteille suite à leur migration à partir d'emballages, les chercheurs ont mis en évidence la pénétration de DEHP dans les denrées alimentaires durant leur transformation, leur conditionnement et leur stockage. Selon les mêmes auteurs, les gants jetables utilisés pour la préparation des repas sont aussi considérés comme une autre source plausible de présence de DEHP, le phtalate que l'on mesure en plus grande quantité, dans la nourriture.

Les enfants peuvent ingérer des phtalates en consommant de la nourriture contaminée et en suçant des objets en PVC (**Ricard**, 2011). En effet, **Almeras** et *al.*, (2010), indiquent que les jouets constituaient une source d'exposition importante pour les enfants notamment du fait qu'ils ont tendance à les porter à la bouche pour les mâcher, les sucer voire en avalant de petits morceaux.

Cependant, une étude récente de **Sathyanarayana**, de l'Université de Washington, publiée le 27 février 2013, révèle que même les aliments biologiques ou préparés artisanalement, cuits et conservés dans des contenants sans plastique peuvent être contaminés aux phtalates, tout simplement parce que l'ensemble de la chaîne alimentaire est contaminé. Les chercheurs ont mesuré les concentrations de DEHP dans les aliments livrés aux familles de l'étude. Les produits laitiers dont le beurre, la crème, le lait et le fromage, avaient des concentrations de plus de 440 ng /g, la cannelle et le poivre de Cayenne supérieures à 700 ng / g, la coriandre 21.400 ng / g. A partir de ces données, les chercheurs ont estimé que la moyenne des enfants âgés de 3 à 6 ans étaient exposés à 183 mg/kg pc/j. Or la limite recommandée par l'Agence américaine de protection de l'environnement (EPA) est de 20 mg / kg / jour.

### 3.6.2. Limites de tolérance de DEHP

Les évaluations de risque effectuées par l'**EFSA** ont abouti à une dose journalière tolérable (**DJT**) de **50 µg/kg pc/j** (**EFSA**, 2005).

En 2010, la **Consumer Product Safety Commission** américaine (**CPSC**) déterminait une **DJT** de **5,8 µg/kg pc/j**.

Selon l'**INSERM** (2011), l'**EFSA** a basé son évaluation sur l'étude de **Wolfe** et **Layton** (2003) mettant en évidence la toxicité du DEHP sur le testicule et les cellules germinales chez le rat. À partir de cette étude, la dose maximale sans effet (**NOAEL**, *no observable adverse effect level*) est estimée à **5 mg/kg pc/j** et un facteur de sécurité de 100 a été appliqué. La **CPSC** a considéré l'étude de toxicité chronique chez le rat de **David** et *al.*, (2000) mettant en évidence un effet sur la spermatogenèse à partir de **5,8 mg/kg pc/j**, la dose minimale ayant entraîné un effet néfaste (**LOAEL**, *lowest observable adverse effect level*). Un facteur de sécurité de 1 000 a été appliqué.

D'après **Ricard** (2011), les évaluations de risques réalisées par l'**ECB** en 2004 ont établi différentes marges de sécurité en fonction des âges (adultes, enfants de 3 à 12 mois et nouveau-nés de moins de 3 mois). Pour les groupes les plus sensibles, des limites plus faibles

devraient donc être appliquées : **25 µg/kg pc/j** pour les enfants de 3 à 12 mois et **20 µg/kg pc/j** pour les nouveau-nés.

Le tableau suivant résume les valeurs toxicologiques de référence de trois agences gouvernementales pour le DEHP.

**Tableau V: Valeurs toxicologiques de référence connues pour le DEHP (OMS, EFSA, CPSC).**

Valeurs toxicologiques de référence de DEHP			
	OMS 2003	EFSA 2005	CPSC 2010
NOAEL (mg/kg/j)	2,5	5	5,8 (LOAEL)
Facteur de sécurité	100	100	1000
DJT (µg/kg pc/j)	25	50	5,8
Espèce	Rat	Rat	Rat
Étude de référence		<b>Wolfe et Layton,</b> 2003	<b>David et al.,</b> 2000

### 3.6.3. Exposition en population générale

L'exposition chez l'adulte au DEHP est estimée en moyenne à environ 2 à 5 µg/kg/j (inférieure à la DJT) de poids corporel par jour d'après les données de concentrations urinaires en DEHP ou de ses métabolites dans les populations occidentales (**INSERM**, 2011)

Une récente étude Allemande de **Heinemeyer et al.**, en 2013, a estimé une exposition moyenne au DEHP via l'alimentation de 3,9 à 9,3 ug/kg/j ( plus faible que DJT fixée par **EFSA** en 2005 et dépasse la DJT fixée par **CPSC** en 2010).

### 3.6.4. Exposition des enfants, nourrissons et nouveau-nés

**Wittassek et al.**, (2007b) ont estimé les niveaux médians d'exposition au DEHP entre 4,3 et 7,8 µg/kg pc/j chez les enfants âgés de 2 à 14 ans ( plus faible que DJT fixée par **EFSA** et dépasse la DJT fixée par **CPSC**). En 2005, l'**EFSA** estimait que l'exposition au DEHP d'enfants de plus de 6 mois consommant des aliments pour bébés prêts à l'emploi était, dans les cas les plus défavorables, de 23,5 µg/kg pc/j (proche de DJT de **EFSA** et dépasse largement DJT fixée par **CPSC**).

### 3.6.5. Exposition *in utero*

Dans sa thèse de doctorat en 2011, **Ricard** indique que l'exposition fœtale a été démontrée dans plusieurs études, elle est corrélée à l'exposition de la mère. Dans leur étude, **Wittassek et al.**, (2009) ont mesuré les concentrations de métabolites des principaux phtalates dans le liquide amniotique récupéré au cours de 11 naissances par césarienne. Le niveau de MEHP a été estimé en moyenne de 1,6 µg/l.

### 3.7. Toxicocinétique et métabolisme

Le DEHP pénètre dans l'organisme essentiellement par orale (pour plus de 75 %); l'absorption digestive est rapide et importante de l'ordre de 50 à 75 % (**INRS** 2013).

Le DEHP se distribue dans le foie, le rein, les testicules et le sang (**INSERM**, 2011 ; **ANSES** 2012 ; **INRS** 2013). Des résidus de DEHP ont été détectés dans le foie des fœtus de rats dont la mère avait été traitée par gavage durant la gestation, démontrant la capacité du DEHP à traverser la barrière placentaire (**Srivastava et al.**, 1989 ; **Stroheker et al.**, 2006).

Le métabolisme du DEHP aboutit à la formation d'une vingtaine de métabolites. Le DEHP est d'abord hydrolysé par des lipases avec formation du mono (2-éthylhexylphtalate) (MEHP), métabolite majoritaire dans le sang, et du 2-éthylhexanol, lui-même étant rapidement hydrolysé en acide 2-éthylhexanoïque. Puis le MEHP est oxydé en différents métabolites et dans une moindre mesure hydrolysé en acide phtalique (**ATSDR**, 2002).

Selon l'**ECB**, (2008), les dérivés monoesters sont souvent plus toxiques que le phtalate de départ, c'est en particulier le cas du MEHP, plus toxique que le DEHP dont il est issu.

Quatre métabolites secondaires du MEHP sont retrouvés dans le sang, chez l'homme : le mono (5-carboxy-2-éthylpentyl) phtalate (5cx-MEPP), le mono (2-éthyl-5 hydroxyhexyl) phtalate (5OH-MEHP), le mono (2-éthyl-5-oxo-hexyl) phtalate (5oxo-MEHP) et le mono (2-carboxyméthyl) hexylphtalate (2cx-MMHP). Ces métabolites sont excrétés sous forme conjuguée à l'acide glucuronique pour environ 60 % (**INRS** 2013).

**Latini** a indiqué en 2005, que les métabolites secondaires du DEHP sont jusqu'à 100 fois plus toxiques que le MEHP.

Sous sa forme libre, le DEHP a une demi-vie sanguine courte de l'ordre de 28 minutes ; le MEHP a demi-vie sanguine supérieure à 3 heures. Les métabolites (5oxo-MEHP, 5OH-MEHP, 5cx-MEPP) ont des demi-vies sanguines comprises entre 2 et 2,5 heures tandis que le 2cx-MMHP présente une demi-vie dans le sang plus longue, d'environ 5 heures. Les métabolites sont éliminés pour une grande partie dans les urines (**INRS** 2013).

Une excrétion dans le lait maternel et une distribution placentaire (détection dans les tissus fœtaux) ont également été rapportées (**ANSES** 2012).

En fin, le rapport d'expertise « reproduction et développement » de l'INSERM en 2011 indique que, si on n'observe pas de bioaccumulation, il est important de signaler que l'exposition est continue du fait de la diversité des sources de contamination.

### 3.8. Toxicité de DEHP sur l'organisme

#### 3.8.1. Effets sur la fonction de reproduction (effets perturbateur endocrinien)

Le DEHP est surtout étudié pour sa toxicité sur la fonction de reproduction mâle et le développement de cette fonction au cours de la grossesse. Ce point est celui qui suscite le plus de débat et d'effervescence, soulevant un problème majeur de santé publique aussi bien en Europe qu'aux Etats-Unis, en raison du large champ d'utilisation de cette molécule.

D'après INRS 2012, « la toxicité pour la reproduction » se traduit par des effets néfastes sur la fonction sexuelle et la fertilité des hommes et des femmes adultes, ainsi que par des effets indésirables sur le développement de leurs descendants.

Le rapport d'expertise collective « reproduction et environnement » de l'INSERM (2011) indique que les périodes d'exposition les plus sensibles sont les expositions lors de la vie intra-utérine et néonatale. Selon le même rapport, la très grande majorité des études chez l'animal ont été réalisées par gavage par voie orale durant la gestation et rapportent des effets sur les trois principaux types cellulaires du testicule : cellules de Leydig, cellules de Sertoli et cellules germinales.

##### 3.8.1.1. Effets *in utero* et néonatale sur le testicule fœtal

Il a été démontré que le DEHP passe efficacement la barrière placentaire et atteint les gonades chez le rat en administrant du DEHP radioactif par voie orale aux rates gestantes (Stroheker *et al.*, 2006).

*In utero*, l'exposition en fin de vie fœtale et début de vie post-natale, au DEHP pour des doses allant de 100 à 1000 mg/kg/jour provoque chez le rat une réduction de la distance ano-génitale de la progéniture mâle (Christiansen *et al.*, 2010; Saillenfait *et al.*, 2011). Saillenfait *et al.*, (2009) constatent que le DEHP entraîne également l'apparition de cas d'hypospadias. Ainsi que de cas de cryptorchidie ou d'anomalies de la descente des testicules (Saillenfait *et al.*, 2011). Par ailleurs, Munczynski (2011) indique que d'autres études de gavages de rattes gestantes ont montré que le DEHP induit un défaut de masculinisation pendant la vie fœtale, qui se traduit par l'apparition à l'âge adulte d'anomalies de la différenciation des caractères sexuels secondaires. En effet, l'exposition au DEHP (500 mg/kg/jour) entraîne un retard d'acquisition de la puberté ainsi qu'une rétention des aréoles et tétons et l'apparition de sévères malformations génitales (Tyl *et al.*, 2004; Saillenfait *et al.*,

2009). **Alam et al.**, (2010) ont constaté que le DEHP (750 mg/kg/jour) administré au cours de la vie fœtale provoque une diminution du poids des testicules et une baisse de la qualité et quantité du sperme, corrélées à une baisse de fertilité (Tableau 6).

**Tableau VI: Effets d'une exposition fœtale au DEHP sur les fonctions testiculaires néonatale de rat.**

Effets de DEHP sur les fonctions testiculaires		
espèce	FONCTION STEROIDOGENE	FONCTION GAMETOGENE
rat	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Cryptorchidie</li> <li>- Hypospadias</li> <li>- Réduction de la distance Ano-Génitale</li> <li>- Retard d'acquisition de la puberté</li> <li>- Rétention des aréoles et des tétons</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution du poids et de la taille des testicules</li> <li>- Diminution de la quantité et de la qualité spermatique</li> <li>- Baisse de la fertilité</li> <li>- Pas de cancer testiculaire</li> </ul>

Récapitulatif des symptômes observables à la naissance après exposition au DEHP pendant la vie fœtale. Les différents effets sont regroupés en deux catégories: Insuffisance fœtale en androgènes (altération de la fonction stéroïdogene) ou altération du développement des cellules germinales (altération de la fonction gamétogene). D'après **Saillenfait et al.** (2009 et 2010.)

### 3.8.1.1.1. Effets sur les cellules de Leydig (Altération de la fonction stéroïdogene)

Le DEHP, qui est classé comme toxique pour la fonction de reproduction, est également incriminé en tant que perturbateur endocrinien chez le rat, de par l'altération de la synthèse des stéroïdes qu'il entraîne (**Munczynski**, 2011).

En effet, le rapport d'expertise collective « reproduction et environnement » de l'**Inserm** (2011), indique que la diminution de la production de testostérone testiculaire en fin de vie fœtale est rapportée de manière quasi systématique chez le rat et que de nombreux travaux, signalent de manière cohérente : la diminution de la production de testostérone et une agrégation des cellules de Leydig et ; une augmentation du diamètre des cordons testiculaires ; l'apparition de gonocytes (cellules germinales fœtales) multinucléés.

D'après **Munczynski**, (2011), l'exposition de rattes pendant la phase de gestation au DEHP (pour des doses de 100 à 1000 mg/kg/jour) entraîne une diminution de la production de testostérone en fin de vie fœtale et l'agrégation des cellules de Leydig sous forme de clusters de cellules au centre du testicule. **Culty**, (2009) a constaté que cette agrégation peut être

accompagnée d'une diminution du nombre total de cellules de Leydig, ainsi que d'une hyperplasie de ces cellules.

Les mécanismes responsables de la diminution de la synthèse de testostérone suivant immédiatement une exposition *in utero* au DEHP chez le rat ont été décrits dans plusieurs études et des résultats concordants décrivent une diminution de l'expression des enzymes de transport du cholestérol et de biosynthèse des hormones stéroïdes. Ce blocage des différentes étapes clefs de la stéroïdogénèse du testicule fœtal explique probablement l'effet net sur la production de testostérone fœtale. (INSERM, 2011).

Les conséquences d'une inhibition de la synthèse de testostérone fœtale sont clairement visibles et encore plus fréquemment rapportées chez les rats traités durant la gestation. Ainsi, différents défauts de masculinisation sont décrits : une diminution de la distance anogénitale, la rétention d'aréoles mammaires ou de mamelons chez le mâle, la diminution de la longueur du pénis, une baisse du poids de la prostate, une augmentation des hypospadias et du taux de cryptorchidie. (INSERM, 2011).

#### **3.8.1.1.2. Effets sur les cellules de Sertoli (Altération de la fonction gamétogène)**

Concernant les cellules de Sertoli, le rapport d'expertise collective « reproduction et environnement » de l'Inserm (2011), indique que plusieurs études ont décrit des effets sur ce type cellulaire lors d'une exposition *in utero*. Le modèle utilisé est essentiellement le rat Wistar gavé au DBP (500 mg/kg/j) pendant la gestation.

Dans ce modèle, un gavage pendant toute l'organogénèse testiculaire (13e au 21e jour de gestation) induit une chute importante, de l'ordre de 50 %, du nombre de cellules de Sertoli en fin de gestation (Fisher et al., 2003). Scott et al., (2008), ont démontré que la prolifération des cellules de Sertoli est réduite en réponse à une exposition aux phtalates *in utero*. En faisant jouer la fenêtre d'exposition, les mêmes auteurs indiquent qu'une exposition en toute fin de vie fœtale (19e-20e jour de gestation) suffit pour diminuer le nombre de cellules de Sertoli. Auharek et al., (2010), décrivent également une diminution du nombre de cellules de Sertoli persistant à la puberté si l'exposition aux phtalates *in utero* est poursuivie par une exposition via la lactation jusqu'au 15eme jour postnatal.

Cette diminution de la prolifération des cellules de Sertoli semble être la cause de la diminution du poids testiculaire à la naissance lors d'une exposition aux phtalates pendant la gestation rapportée par de nombreux auteurs. En effet, les cellules de Sertoli sont le type cellulaire majoritaire dans le testicule en fin de vie fœtale. (Fisher et al., 2003 ; Jonhson et al., 2008 ; Boekelheide et al., 2009).

En plus de diminution de la prolifération, **Munczynski**, (2011) a rapporté un défaut de maturation et une vacuolisation des cellules de Sertoli.

Les cellules de Sertoli ayant pour fonction, entre autres, d'être un support du développement des cellules germinales, ces données peuvent aisément expliquer la réduction du nombre de cellules germinales observée durant la vie fœtale, comme à l'âge adulte (**Ferrara et al.**, 2006). En effet, selon les mêmes auteurs, le traitement *in utero* de rats aux phtalates entraîne une diminution du nombre de cellules germinales en fin de vie fœtale. L'ensemble de ces données sur la diminution du nombre de cellules germinales (précurseurs de la spermatogénèse adulte) pendant la vie fœtale, permet d'étayer l'hypothèse d'une origine fœtale de la diminution de production spermatique observable à l'âge adulte. (**Ferrara et al.**, 2006).

### 3.8.1.1.3. Effets sur les cellules germinales

Concernant les cellules germinales, le phénomène le plus visible immédiatement après une exposition *in utero* aux phtalates est l'apparition de cellules germinales anormales, multinucléés. Il semble que des doses supérieures ou égales à 100 mg/kg/j soient nécessaires pour induire l'apparition de ces gonocytes multinucléés. Ces cellules sont observées en fin de vie fœtale et disparaissent peu après la naissance vers 10 jours (**Fisher et al.**, 2003).

**Tableau VII : Effets d'une exposition fœtale aux phtalates sur les différents types cellulaires du testicule fœtal de rat.**

Espèce	Cellules de leydig	Cordons séminifères
Rat	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution de la production de testostérone</li> <li>- Agrégation des cellules de Leydig (avec généralement une hyperplasie des cellules)</li> <li>- Localisation anarchique des cellules de Leydig au sein des cordons</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altération de la structure des cordons</li> <li>- Défaut de maturation des cellules péritubulaires</li> <li>- Défaut de maturation des cellules de Sertoli</li> <li>- Diminution du nombre et de la prolifération des cellules de Sertoli</li> <li>- Perturbation de la communication entre cellules de Sertoli et cellules germinales</li> <li>- Diminution du nombre de cellules germinales</li> <li>- Apparition de gonocytes plurinucléés.</li> </ul>

Le tableau rassemble les effets d'une exposition *in vitro* ou *in utero* pendant la période fœtale, sur les cellules de Leydig ainsi que sur les cellules composant les cordons séminifères (cellules de Sertoli et cellules germinales). (D'après INSERM, 2011).

### 3.8.1.2. Effets lors d'une exposition périnatale

D'après le rapport d'expertise collective « reproduction et environnement » de l'INSERM (2011) plusieurs auteurs ont adressé la question de savoir si les phtalates pouvaient également agir comme des anti-androgènes en inhibant la croissance des organes androgéno-dépendants à travers une exposition par voie orale pendant la gestation et pendant la lactation. En règle générale, indique INSERM (2011), les effets d'une exposition *in utero* et pendant la lactation sont supérieurs à ceux induits uniquement pendant la gestation. Ainsi, Gray et al., (2009) ont exposé des rats Sprague-Dawley du 8<sup>ème</sup> jour de gestation au 17<sup>ème</sup> jour de vie postnatale à 300 mg/kg/j de DEHP et analysé les effets chez l'adulte (65 jours). Les auteurs décrivent alors une diminution du poids des testicules de la prostate ventrale et des vésicules séminales qui s'accompagne d'une diminution du nombre de spermatozoïdes.

L'exposition *in utero* et lactationnelle diminue, d'après ANSES (2012), de manière plus importante que l'exposition *in utero* seule, la distance anogénitale et la longueur du pénis mesurés à la puberté selon les mêmes auteurs.

### 3.8.2. Toxicité aiguë

Chez l'Homme et l'animal, il n'y a pas de toxicité aiguë observée par ingestion de DEHP, (par voie orale : DL50 : 20 000 mg/kg chez le rat) (ECB, 2008).

### 3.8.3. Toxicité subchronique et chronique autre que reprotoxique

D'après ANSES (2012), chez l'animal, les organes cibles affectés par une exposition orale au DEHP sont principalement le foie, les reins, et dans une moindre mesure le système nerveux. En effet, des résidus de DEHP ont été détectés dans le foie des fœtus de rats dont la mère avait été traitée par gavage durant la gestation, démontrant la capacité du DEHP à traverser la barrière placentaire (Srivastava et al., 1989 ; Stroheker et al., 2006).

Munczynski, (2011) indique que le foie est le premier organe cible identifié de l'effet délétère des phtalates. Selon l'auteur l'effet le plus évident d'une contamination chronique au DEHP par voie orale se traduit par une hépatomégalie prononcée, conséquence d'une hyperplasie et d'une hypertrophie des hépatocytes qui s'accompagne d'une accumulation de lipides. Au niveau fœtal, l'exposition *in utero* au DEHP (25 et 100 mg/kg/jour) de souris entre 11 et 19 de gestation entraîne une augmentation de l'hépatostéatose (rétention des

triglycérides dans les vacuoles hépatocytaires) ainsi que la réduction du stockage du glycogène dans le foie des fœtus, et ce de manière dose dépendante (**Maranghi et al.**, 2010).

Au niveau rénal, une augmentation du poids du rein et une minéralisation des papilles rénales sont essentiellement observées après des expositions chroniques au DEHP par voie orale chez le rat (**ANSES** (2012)).

#### 3.8.4. Cancérogénicité

**ANSES** (2012), indique que le centre international de recherche sur le cancer (**CIRC**) a reclassé le DEHP en 2011 comme substance cancérogène possible pour l'Homme (du groupe 3 au groupe 2B) sur la base de données animales.

#### 3.8.5. Génotoxicité/ Mutagenicite

L'**ECB** conclut que les études menées sur l'animal ne permettent pas de classer le DEHP parmi les substances génotoxiques ni mutagène.

#### 3.8.6. Tératogénicité

Chez le rat et la souris, des effets tératogènes, incluant notamment une augmentation de la mortalité fœtale, du nombre de fœtus résorbés ou du nombre de malformations chez les survivants, ont été décrits suite à l'ingestion de DEHP (**ANSES** 2012).

### 3.9. Mécanismes d'action cellulaires de DEHP dans le testicule

Les travaux expérimentaux décrivant l'impact délétère des phtalates sur le testicule fœtal de rat ont amené à considérer l'altération de la production de testostérone comme l'action majeure de ces composés (**Muczynski** 2011).

Chez le rat, les études d'analyse de gènes réalisées ont montré que l'exposition *in utero* au DEHP entraîne la modulation de l'expression d'un grand nombre de gènes du testicule fœtal (**Shultz et al.**, 2001; **Liu et al.**, 2005; **Johnson et al.**, 2007). Les auteurs ont notamment mis en évidence une diminution de l'expression de plusieurs familles de gènes impliqués dans la régulation et le transport du cholestérol ainsi que dans la synthèse de testostérone. **Muczynski** a indiqué en 2011 que c'est la diminution d'expression de ces différents gènes impliqués dans la chaîne de synthèse des stéroïdes qui serait responsable de la baisse de production de testostérone pendant la vie fœtale.

Concernant l'agrégation des cellules de Leydig pendant la période fœtale, **Fisher et al.**, (2003) et **Lin et al.**, (2008) ont indiqué que différentes études montrent que cet effet n'est pas due à une augmentation du nombre des cellules mais plutôt à une altération de leur répartition dans le testicule, suite à un défaut de migration. Quant aux cellules germinales, **Muczynski** (2011) et **INSERM** (2011) ont indiqué que l'observation de la diminution de leur

nombre, l'augmentation de leur apoptose et de l'apparition de gonocytes plurinucléés a soulevé une importante question à l'heure actuelle encore non résolue d'après plusieurs études.

---

*PARTIE B*

*ETUDE EXPERIMENTALE*

---

---

*MATERIELS ET METHODES*

---

## I. Matériels

### 1.1. Matériel chimique

Les deux matériaux utilisés sont des formulations industrielles des emballages alimentaires (films en PVC alimentaires). Ceci permet de donner à cette étude un aspect plus appliqué et concret. Il s'agit de:

- Poly (chlorure de vinyle) (PVC)  $-(CH_2=CHCl)_n-$ , de marque SHINTECH sous forme de résine blanche pure fourni par TRANSPOLYMERES : Entreprise Nationale des Plastiques et Caoutchoucs (ENPC). (La fiche technique est jointe en annexe I).

NB : Au début de l'étude nous avons commencé à travailler sur des films alimentaires en PVC (destinés à la biscuiterie) qui contiennent un plastifiant de type phtalate, fournis par AVANCE FOOD, fournisseur des fournitures d'emballage et de conditionnement, ALGER, lui-même les, a importé de la société productrice EL MARAGHY PACK pour les matériaux d'emballage et d'impression EGYPTE avec l'étiquette dessus qui indique qu'il s'agit de PVC. Mais, la formule exacte des films et la concentration initiale de ce plastifiant ne nous ont pas été communiquées. Il a donc été nécessaire de les déterminer à l'aide de différentes techniques d'analyse disponibles au laboratoire. En effet l'IR a confirmé la présence de DEHP dans tous les films fournis mais la surprise c'est que il ne s'agit pas de PVC pour la plupart des films (contrairement à ce qui a été indiqué sur l'étiquette) mais d'un autre polymère non identifié, ce qui a été confirmé par la non solubilisation des films en question dans la THF. C'est pourquoi nous avons choisi de préparer nous même les films au laboratoire à base des matières premières.

- Di (2-éthylhexyl) phtalate (DEHP),  $(C_{24}H_{38}O_4)$  de marque LG CHIMICAL, fourni par ENCP. (La fiche technique est jointe en annexe II)
- Ethanol absolu  $C_2H_5OH$  (simulant d'aliments)
- THF (tetrahydrofurane)  $C_4H_8O$  comme solvant.

### 1.2. Matériel biologique

Nous avons utilisé 17 rattes et 6 rats de souche Wistar sexuellement matures de poids corporel compris entre 242 et 252g, provenant de l'élevage du CRD dans une animalerie maintenue entre 22 °C et 24 °C, avec hygrométrie stable, et munie d'un système de ventilation et d'un système réglant les périodes d'obscurité (10 h) et de lumière (14 h). Les animaux ont accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau.

**II. Méthodologie expérimentale**

**2.1. Etude de la toxicité pour la reproduction**

L'étude de la toxicité pour la reproduction a été réalisée conformément à la ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques numéro 443 relatif à l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération. 2012.

**Tableau VIII : Protocole de l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération**

		traitement			
		Avant accouplement	Accouplement	Après accouplement	
P ♀	2 semaines	2 semaines	Gravidité	Lactation	
			Développement <i>in-utero</i>	sevrage	sacrifice

**2.1.1. Les animaux**

Les femelles sont réparties au hasard en trois groupes de manière à ce que les poids moyens de chaque groupe soient comparables ( $\pm 20\%$  de la moyenne globale). L'un des groupes, servant de témoin (T) (5 femelles), reçoit de l'eau distillée (véhicule). Les deux autres (6 femelles par groupe), servant de traités, reçoivent le DEHP par gavage quotidien à raison de 100 mg/kg/j (groupe D1) et 1000 mg/kg/j (groupe D2) (ajustées en fonction de poids corporel) durant toute la période de l'expérimentation (avant et pendant l'accouplement, pendant la gestation et la lactation jusqu'au sevrage des petits. Les rats mâles ne sont pas traités, ils sont réservés uniquement pour l'accouplement.

Les animaux sont hébergés par groupe de 3 dans des cages en polypropylène et en polycarbonate présumées exemptes de phtalates. Chaque animal a été identifié avec un numéro unique sur la queue avant le début du traitement.

Les animaux témoins et traités sont peser au moins une fois par semaine avant la gestation et au moins deux fois par semaine pendant la gestation et lactation.

**2.1.2. Le choix de doses**

En nous référant à la littérature, nous avons utilisé deux niveaux de doses de DEHP, 100 et 1000 mg/kg/j, connues pour affecter le niveau de la testostérone et capables d'induire des altérations au niveau de l'appareil reproducteur mâle.

**2.1.3. Préparation de la solution à administrée**

La dose reçue par chaque femelle est calculée sur la base de poids corporel, et est ajustée au moins une fois par semaine pour les femelles nos gravides et allaitantes et tous les deux jours pour les femelles gravides. Nous avons choisi l'eau distillée comme véhicule, le

volume de suspension (DEHP + eau distillée) administré pour chaque femelle est de 1ml par un gavage quotidien 7jour sur 7 jusqu'à la nécropsie des petits au sevrage (21JPN).

Le calcul de la dose à administrée se fait comme suivant :

Pour la dose 100 mg/kg/j (par exemple) au premier jour de l'expérimentation nous avons le poids moyen des femelle de 242g.

En appliquant la règle de trois nous calculons la dose à administrée pour chaque femelle.

$$\left. \begin{array}{l} 100\text{mg} \longrightarrow 1000\text{g} \\ X \text{ mg} \longrightarrow 242\text{g} \end{array} \right\} X = 24,2 \text{ mg}$$

Donc la dose à administrée pour chaque femelle est de 24,2 mg

Pour préparer un volume Y de suspension (10 ml par exemple) on multiplie le X (24,2 mg) par Y le volume voulu (10 ml) on aura 242 mg de DEHP/ 10 ml de suspension.

Pour préparer la suspension, nous pesons 242 mg de DEHP dans une fiole puis nous ajustons jusqu'à 10 ml par l'eau distillée, l'émulsion est stabilisée par deux gouttes de TWEEN 80.

Après une agitation de 3mn à 1800tr/mn la suspension est prête pour l'utilisation (gavage).

On fait la même chose pour la deuxième dose.

#### **2.1.4. L'accouplement**

L'accouplement a été fait en polygamie, un mâle pour 3 femelles, jusqu'à l'apparition des signes de grossesse. Le jour 0 de la gestation est celui où l'accouplement est avéré (observation de sperme ou d'un bouchon vaginal).

Les femelles gravides sont séparées dans des cages individuelles des qu'elles sont pleines.

#### **2.1.5. Taille des portées**

La taille des portées et le sexe des ratons sont déterminés le jour de la naissance (1JPN), les ratons sont pesés le 1JPN, 14JPN et 21JPN.

#### **2.1.6. La distance anogénitale (DAG)**

La DAG de chaque petit mâle a été mesurée le jour de sacrifice (21JPN) à l'aide d'un pied à coulisse, rapportée à la racine cubique de poids corporel comme l'indique l'article 45 de protocole de l'OCDE.

#### **2.1.7. Prélèvement des échantillons**

Tous les ratons mâles sont sacrifiés au 21JPN (sevrage) par décapitation pour éviter l'effet du stress. Le sang de la plaie est récupéré dans des tubes secs, placé à froid, puis centrifugé. Le sérum est congelé pour le dosage de la testostérone sérique. Les testicules, les

reins et le foie sont prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux s'il y en a puis pesés. Les deux testicules sont fixés dans du formol 10% pendant 24H pour l'analyse histologique.

#### **2.1.8. Dosage de la testostérone sérique**

Pour le dosage de la testostérone nous avons pris au hasard deux (2) échantillons par portée. Le dosage a été fait par la technique radioimmunologique (RIA), c'est une technique très sensible qui a un seuil de détection de 0,1 nmol/l. Cette technique est basée sur le principe de la compétition réaction entre un anticorps et deux antigènes identiques l'un d'eux est marqué l'autre est à dosé. La testostérone est marquée à l'iode 125 (élément radioactif). L'anticorps est préalablement fixé à la paroi des tubes. La testostérone à doser (échantillon) et la testostérone marquée (traceur) sont ajoutées simultanément aux tubes renfermant les anticorps. Après homogénéisation et incubation, la fraction libre est séparée par aspiration. La fraction liée attachée à la paroi des tubes est mesurée à l'aide d'un compteur gamma relié à un ordinateur. Elle est inversement proportionnelle aux taux de la testostérone ajoutée (échantillon). La concentration en testostérone de l'échantillon est donnée directement en nmol/l. (1nmol/l= 0,31 ng/ml).

#### **2.1.9. Étude histologique des testicules**

Nous avons suivi les étapes classiques de l'histologie. La déshydratation s'est fait par bains successifs de 30 min d'éthanol (70, 95, 100%) puis l'éclaircissement par deux bains successifs de 30 mn de toluène. Les pièces sont ensuite mises dans de la paraffine liquide (60°C) pendant au moins 4h puis incluses dans un bloc de paraffine. Les blocs sont coupés au microtome avec une épaisseur de coupe de 5 microns.

Les rubans des coupes sont incluses dans un bain de gélatine dissoute dans l'eau, puis montées sur les lames, en suite déparaffinées dans une succession de bains de toluène et réhydratées progressivement par des bains de 3 min d'éthanol de concentration décroissante.

Pour la coloration, nous avons utilisé la technique à l'hématoxyline-éosine (HE). Les lames sont plongées 5 mn dans l'Hématoxyline (colorant nucléaire bleu), puis plongées dans l'Eosine (colorant cytoplasmique rose) et rincées à l'éthanol 100. Après une nouvelle série de bains de toluène pour la déshydratation, les lames sont montées dans la résine Eukitt pour coller les coupes entre lame et lamelle. Les bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

- **Exploitation statistique des résultats**

Elle est effectuée à l'aide du test T de Student,  $P \leq 0.05$  est considéré comme significatif. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM, avec signalisation si la différence avec les témoins est significative ou non.

## **2.2. Etude de la migration du DEHP du PVC plastifié vers certains simulants de denrées alimentaires**

L'étude de la migration du DEHP a été réalisée conformément au règlement de 2011 de l'Union Européenne No 10/2011 de la commission du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires. Notre étude est basée sur :

- Caractérisation spectroscopique dans l'ultraviolet et l'infrarouge des matières premières : le PVC et le DEHP.
- Validation des méthodes analytiques pour l'identification et la quantification du DEHP dans le PVC par spectrométrie dans l'infrarouge et dans les milieux simulateurs d'aliments (Ethanol 100% et Ethanol/eau 50/50%) par spectrométrie dans l'UV-Visible.
- Des essais de migration réalisés par immersion des films en PVC plastifié dans des milieux simulateurs d'aliments.
- Application des deux méthodes (UV visible et IR) au suivi de la cinétique de migration du DEHP dans les deux milieux sélectionnés

### **2.2.1. Choix des simulants de denrées alimentaires**

Le règlement 2011 cité ci-dessus, affecte chaque simulant à une catégorie de denrées alimentaires. Les simulants utilisés dans notre études et les denrées alimentaires pour les quelles ils ont été affectés sont représentés dans le tableau suivant ;

**Tableau IX : les simulants et leur affectation aux catégories de denrées alimentaires**

Simulant	Abréviation	Denrées alimentaires
Ethanol à 50% (v/v)	D1	Moyennent grasses: Lait et produits laitiers. Boissons troubles, boissons alcoolisées.....
Huile végétale (remplacée par éthanol absolu)	D2	Graisses et huiles. Produits de la boulangerie, biscuiterie, pâtisserie présentant des matières grasses en surface, Chocolats, confiserie. viandes et œufs...

### 2.2.2. Conditions d'essais

Les films sont mis en contact avec le simulant de manière à reproduire les mêmes conditions d'emploi adaptées à la denrée alimentaire visée quant à la durée et à la température de contact. (Tableau XI). (Règlement 2011 ANNEXE V pg 83)

**Tableau X : Conditions d'essais de migration**

Durée de contact en jours [j] ou heures [h] à la température de contact [°C]	Conditions de contact prévues	simulant utilisé
<b>2 h à 70 °C</b>	Toute condition comprenant le chauffage à 70 °C au maximum pendant 2 heures au maximum ou le chauffage à 100 °C au maximum pendant 15 minutes au maximum, non suivie d'un entreposage de longue durée à température ambiante ou à l'état réfrigéré.	D1 et D2
<b>10 j à 50 °C</b>	L'essai pendant 10 jours à 50 °C couvre toutes les durées d'entreposage à l'état réfrigéré et congelé, y compris le chauffage à 70 °C au maximum pendant 2 heures au maximum ou le chauffage à 100 °C au maximum pendant 15 minutes au maximum et les durées d'entreposage de maximum six mois à température ambiante.	D2

### 2.2.3. Préparation des films en PVC

Nous avons préparé des films en PVC à 30% de DEHP en mélangeant 30 g de DEHP avec 70 g de PVC, l'ensemble est dissout dans 100 ml de THF. Une solution homogène incolore est ainsi obtenue. Des quantités liquides de même volume sont versées sur un support en verre (boite de pétri). Celles-ci sont placées sous hotte pour évaporer le solvant pendant 24 heures à température ambiante. Les films secs sont par la suite détachés du support en verre et déposés sur une feuille de papier filtre et placés dans l'étuve à 60°C pour éliminer le solvant résiduel. Dans les films bien secs nous avons découpé des carrés de dimension (2x2 cm<sup>2</sup>), de masses voisines et d'épaisseur moyenne (120µm±10µm).

#### **2.2.4. La cellule de migration**

Elle est constituée d'une série de tubes en verre à fermeture hermétiques, d'une série de films de même masse et de liquide simulateur. Dans chaque tube nous avons introduit 10 ml de liquide et un film carré (2x2cm<sup>2</sup>).

Les prélèvements sont faits chaque 10mn, le film est séparé du liquide ensuite remis à l'étuve pour éliminer les traces du solvant résiduel.

#### **2.2.5. Les techniques d'analyses utilisées**

##### **2.2.5.1. Spectrométrie Infrarouge (IRTF)**

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été appliquée aux films plastiques avant et après les essais de migration, à la résine de base et au DEHP.

La spectrométrie infrarouge permet d'identifier la nature des fonctions chimiques présentes au sein du polymère à partir de la détection des modes de vibration caractéristiques des liaisons chimiques. La spectrométrie infrarouge en mode transmission permet, en plus de l'identification des groupements fonctionnels, la détermination de leur concentration via la loi de Beer-Lambert.

Les spectres IR ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre IRTF de type Perkin Elmer C 91380 avec une résolution spectrale de 4 cm<sup>-1</sup>, dans un domaine de nombre d'onde s'étendant de 4 000 à 450 cm<sup>-1</sup>.

##### **2.2.5.2. Spectrométrie ultraviolet (UV)**

La spectrométrie ultraviolet-visible est une technique d'analyse dans laquelle les molécules, qui sont soumises à un rayonnement dans le domaine ultraviolet-visible (de 400 à 800 nm), subissent une transition électronique impliquant les photons.

Les analyses par spectrométrie ultraviolet ont été réalisées dans l'étude cinétique de la migration de DEHP dans les deux simulants utilisés.

##### **2.2.5.2.1. Conditions opératoires et validation de la méthode**

###### **2.2.5.2.1.1. Choix de la longueur d'onde**

Afin de sélectionner des bandes spécifiques au DEHP, plusieurs solutions ont été préparées ;

Solution1 : 0.02mg/ml de DEHP dans l'Ethanol

Solution2 : 0.02mg/ml de DEHP dans un mélange Ethanol/eau 50/50%

Solution3 : obtenue par chauffage à reflux pendant 2h d'un film en PVC vierge dans l'Ethanol

Solution4 : obtenue par chauffage à reflux pendant 2h d'un film en PVC vierge dans un mélange Ethanol/eau 50/50%.

Un balayage a été réalisé par un spectrophotomètre UV visible type SHIMADZU UV-1601 sur les quatre solutions entre 200 et 800 nm.

**2.2.5.2.1.2. Linéarité de la méthode**

Pour la réalisation de l'étude, une gamme d'étalonnage a été préparée dans les deux milieux de simulation ; les différentes solutions ont été analysées par spectrométrie dans l'UV-visible.

Le choix des concentrations a été fait de telle sorte que les absorbances correspondantes ne dépassent pas 1 conformément à la loi de Beer – Lambert donnée par la formule :

$A = \epsilon l C$
A : absorbance L : le trajet optique (cm) $\epsilon$ : coefficient d'extinction molaire ( $l\ g^{-1}cm^{-1}$ ) C : concentration (g/l)

**2.2.5.2.1.3. Sensibilité de la méthode**

Pour étudier la limite de détection (la plus petite quantité qui peut être détectée et quantifiée), des dilutions successives ont été faites sur la plus petite concentration de la gamme d'étalonnage dans les deux milieux. Les différentes solutions obtenues ont été analysées par spectrométrie UV-visible.

---

# *RESULTS*

---

## I. Résultats de l'étude toxicologique

Les différentes observations constatées durant toute la période de l'expérimentation sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau XII : Etude préliminaire, résultats récapitulatifs**

		TEMOIN	100 mg/kg/j	1000 mg/kg/j
avant accouplement	nombre de femelles parentes	5	6	6
	PC moyen (g)	252± 4,89	252 ± 5,11	242 ± 6,13
	mortalités	2	0	0
gestation	% de femelle gestante	100%	83%	100%
	retard à concevoir	-	-	+
	durée de gestation (jours)	21,66 ±0,66	21,4 ± 0,24	27 ± 2,3
	mortalité	0	0	1
mise bas	taille de portée	10 ± 2	8 ± 3	5 ± 2
	nbr total des ratons	30	43	29
lactation et sevrage	mortalité au 1JPN	0	3	10
	nbr des ratons survivants	30	40	19
	% des mâles	0,5	0,57	0,36
	sexe ration	1	1,35	0,58
	PC 1JPN (g)	5,95 ± 0, 22	5,60 ± 0, 12	5,22 ± 0,14
	PC 14 JPN (g)	18,86 ± 1,12	20,78 ± 0,85	26 ± 0,43
	PC 21 JPN (sevrage)	27,266 ± 0,992	33,217 ± 1,863	25,142 ± 4,306

### 1.1. L'évolution pondérale des femelles parentes

Nos résultats montrent que l'exposition au DEHP durant toute la période de l'expérimentation, avant accouplement, gestation et pendant la lactation, n'a pas d'incidence significative sur les poids des traitées par rapport aux témoins (figure 6), cependant des changements intergroupes et intragroupes bien que ne sont pas significatifs ont été observés chez les femelles exposées à la forte dose (1000 mg/kg/j) pendant la gestation par rapport aux témoins et aux traitées par la faible dose (100mg/kg/j).



**Figure 6 : Effet d'une exposition au DEHP sur l'évolution pondérale des femelles parentes avant accouplement et pendant la gestation et la lactation.**

## 1.2. Résultats préliminaires

### 1.2.1. Avant accouplement

L'exposition au DEHP avant accouplement n'a aucune incidence significative sur l'évolution pondérale ni sur le comportement des animaux. Aucun signe de toxicité générale n'a été enregistré chez les traités, cependant nous avons enregistré deux mortalités chez les témoins.

### 1.2.2. Gestation

Un taux de gestation de 100% à été observé chez les témoins et les traitées par la deuxième dose, 83% chez les traitées par la première dose. (Une femelle non gestante).

Pendant la gestation, aucune mortalité, aucun changement de comportement ni signe de toxicité générale n'a été observé chez les traitées par la première dose par rapport aux témoins, toutefois nous avons enregistré une mortalité au 18 jours de gestation chez les traitées par la deuxième dose et plusieurs signes de toxicité générale ont été observés à savoir, un retard important à concevoir, une gestation prolongée ( $27j \pm 2,3$  contre  $21,4j \pm 0,24$  et  $21,66j \pm 0,66$  chez les traitées par la première dose et les témoins), et une évolution pondérale perturbée.

### 1.2.3. Mise bas

La durée de la mise bas n'a pas été enregistrée, la taille des portées était différente chez les traitées par rapport aux témoins, nous avons enregistré une différence non significative entre les traitées par la première dose et les témoins, ( $8 \text{ ratons} \pm 3$  contre  $10 \text{ ratons} \pm 1$  chez les témoins) et une diminution significative de la taille des portées chez les traitées par la deuxième dose ( $5 \text{ ratons} \pm 2$ ).

Pour le sexe ration, nous n'avons pas enregistré une différence significative entre les traitées par la première dose (1) et les témoins (1,35). Cependant une diminution significative à été observée chez les traitées par la deuxième dose (0,58).

Quant aux mortalités nous avons enregistré dix (10) chez les nouveaux nés des traitées par la deuxième dose, trois (3) chez les traitées par la première dose et aucune mortalité chez les témoins.

L'exposition au DEHP *in utero* n'a pas d'incidence significative sur le poids des ratons à la naissance, toutefois nous avons observé une légère diminution chez les traités, en effet nous avons enregistré  $5,60g \pm 0,12$  et  $5,22g \pm 0,14$  chez les traitées par la première et la deuxième dose respectivement contre  $5,95g \pm 0,22$  chez les témoins.

### 1.2.4. Lactation

L'exposition des mères allaitantes au DEHP pendant la lactation a une forte incidence sur l'évolution pondérale des ratons, en effet, au 14<sup>ème</sup> JPN nous avons observé une augmentation de 10% et de 37 % chez les ratons des traitées par la faible et la forte dose respectivement, par rapport aux témoins. Au 21<sup>ème</sup> JPN (sevrage) une chute de poids de 7,77% à été enregistrée chez les mâles exposés à la forte dose, et une augmentation de 21,82% chez les mâles exposés à la faible dose par rapport aux témoins.

Aucune mortalité n'a été enregistrée pendant la lactation.

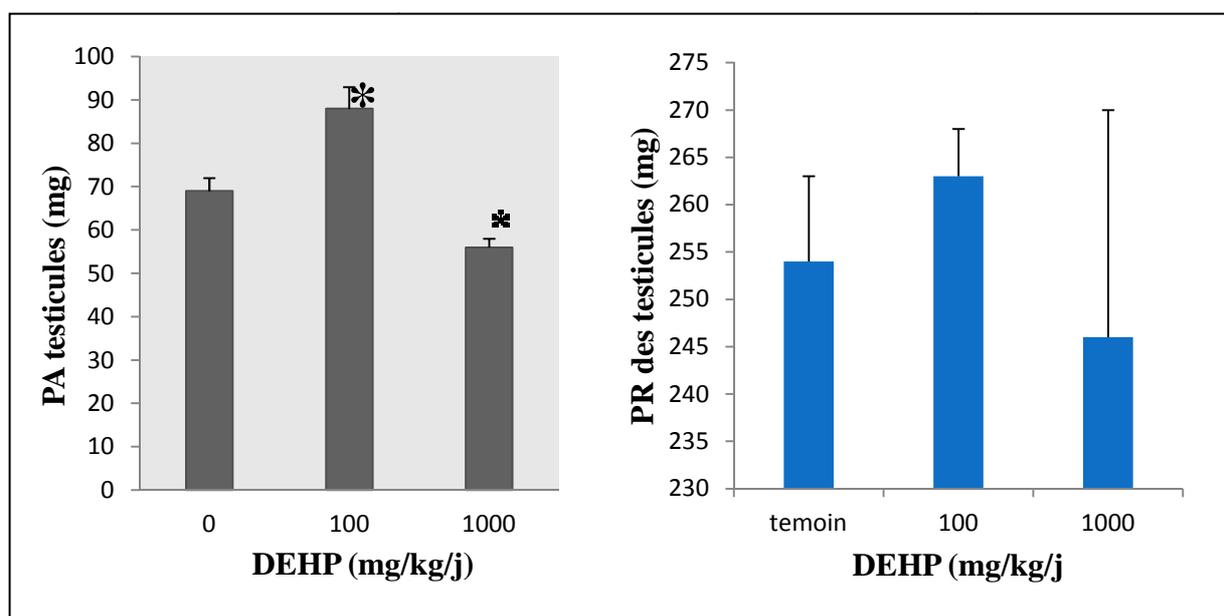
### 1.3. Poids relatifs et absolus des organes

**Tableau XIII : Effet d'une exposition *in utero* et pendant la lactation sur les poids relatifs et absolus du foie et des reins chez le rat mâle de 21JPN.**

	foie (g)		reins (g)	
	PA	PR	PA	PR
Temoins	1,095 ± 0,050	4,033 ± 0,149	0,161 ± 0,006	0,593 ± 0,017
100 mg/kg/j	1,333 ± 0,105	3,930 ± 0,115	0,179 ± 0,009	0,546 ± 0,010
1000 mg/kg/j	0,989 ± 0,259	3,650 ± 0,285	0,157 ± 0,022	0,641 ± 0,020

Nos résultats montrent de légères variations des poids absolus et relatifs du foie et des reins des traités par rapport aux témoins, en effet les poids absolus de foie et des reins montrent une légère augmentation chez les traités par la faible dose et une légère diminution chez les traités par la forte dose. Quant aux poids relatifs, le foie montre une légère diminution chez les traités par la forte et la faible dose et le rein montre une diminution chez les traités par la faible dose et une légère augmentation chez les traités par la forte dose. Néanmoins ces variations sont statistiquement non significatives.

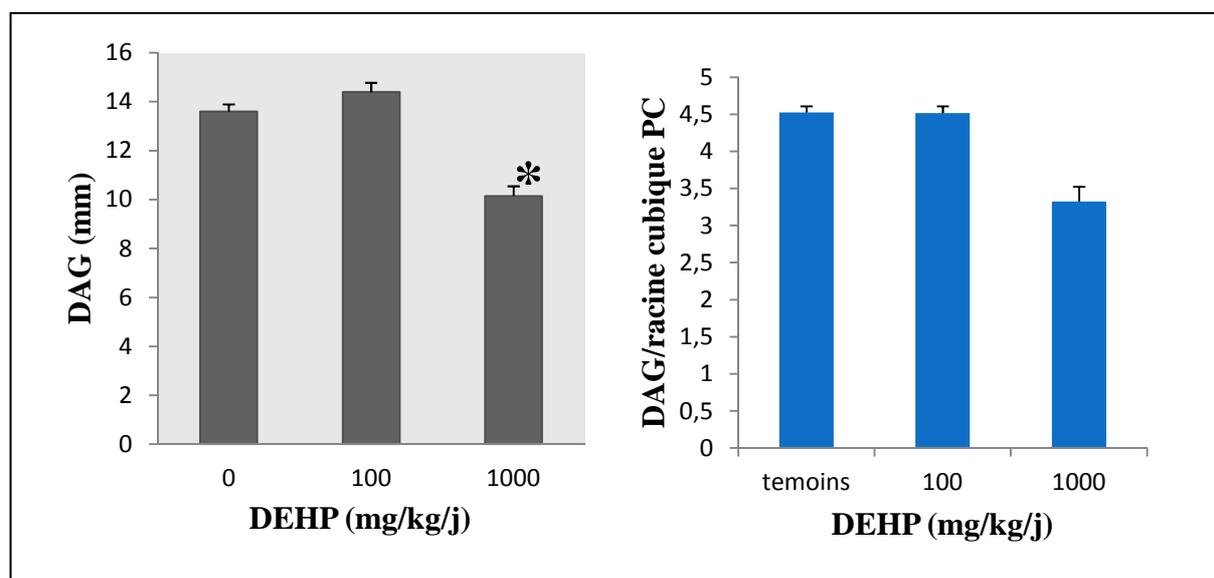
Toutefois, les poids absolus des testicules montrent une augmentation de 27%, statistiquement significative chez les mâles exposés à la faible dose de DEHP (100 mg/kg/j), et une diminution de 18,84%, statistiquement significative chez les mâles exposés à la forte dose (1000 mg/kg/j). Les poids relatifs quant à eux montrent des variations statistiquement non significatives chez les traités par les deux doses par rapport aux témoins, en effet, nous avons enregistré une augmentation de 3,54% chez les traités par 100 mg/kg pc/j et une diminution de 3,14% chez les traités par 1000 mg/kg pc/j. (fig7).



**Figure 7 : Effet d'une exposition *in utero* et pendant la lactation au DEHP sur les poids relatifs et absolus des testicules chez le rat mâle de 21JPN.**

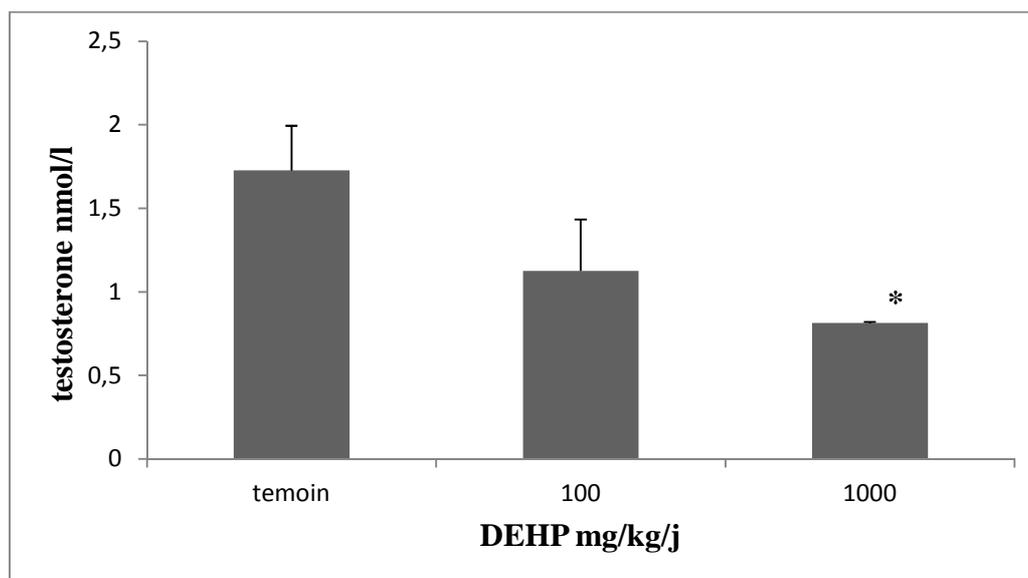
#### 1.4. Distance anogénitale (DAG)

La DAG mesurée au 21JPN montre une diminution de 25,44%, statistiquement significative ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ ) chez les mâles exposés à la forte dose (1000 mg/kg/j), et une légère augmentation de 5,8%, statistiquement non significative chez les mâles exposés à la faible dose. Cependant, la DAG rapportée à la racine cubique du poids corporel (DAG/racine cubique PC) montre une diminution drastique de 34,02 %, statistiquement hautement significative ( $p < 0,001$ ) chez les traités par 1000 mg/kg/j et une légère diminution de 0,19 % chez les traités par 100 mg/kg pc/j.



**Figure 8 : Effet d'une exposition *in utero* et pendant la lactation au DEHP sur la distance anogénitale chez le rat mâle de 21JPN.**

### 1.5. Dosage de la testostérone



**Figure 9 : Effet d'une exposition *in utero* et pendant la lactation au DEHP sur le taux de la testostérone chez le rat mâle nés de 21JPN.**

Le dosage de la testostérone chez les rats mâles nés des mères exposées *in utero* et pendant la lactation au DEHP montre une diminution de 52,8 %, statistiquement significative par rapport aux témoins chez les mâles exposés à la forte dose (1000 mg/kg/j) et une diminution de 34%, statistiquement non significative, chez les mâles exposés à la faible dose (100 mg/kg/j).

### 1.6. Histopathologie

Les coupes histopathologiques des testicules ont révélé une immense altération de la structure histologique chez tous les animaux exposés à 1000 mg/kg pc/j par rapport aux témoins qui montrent une bonne intégrité, des tubes séminifères serrés avec des espaces interstitiels étroits. En effet à 1000 mg/kg pc/j, nous avons observé un desserrage du tissu conjonctif qui s'est traduit par des espaces interstitiels très importants dans les quels se dispersent quelques cellules de Leydig (nombre très faible) en agrégats avec hyperplasie phénomenale. Nous avons aussi observé une hémorragie interstitielle sporadique. Quant aux cellules de Sertoli nous avons observé presque une disparition, diminution drastique de leur nombre avec une très petite taille accompagnées d'un nombre réduit de cellules germinales qui montraient des signes réduits de différenciation (petite activité). En opposition, les coupes histopathologiques des testicules des animaux exposés à 100 mg/kg pc/j révèlent une intégrité plus homogène de la structure histologique avec de légères altérations à savoir : des espaces interstitiels larges par rapport aux témoins, dans les quels se trouve les cellules de Leydig d'une taille plus grande et en un nombre réduit par rapport aux témoins. Les cellules de Sertoli présentent un bon aspect accompagnées d'une couche épaisse et homogène de cellules germinales qui ne présentent aucun signe d'altération ni de différenciation.

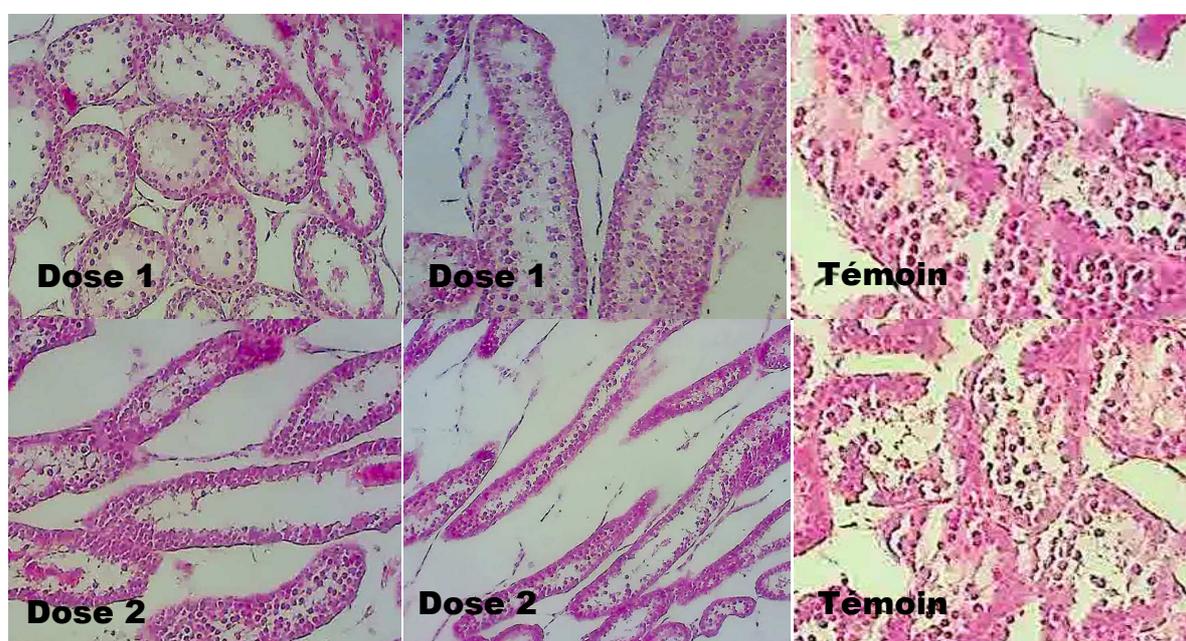


Figure 10 : Structure histologique des testicules de rats témoins et traités par DEHP.

## II. Résultats de l'étude de migration

### 2.1. Caractérisation initiale et validation de la méthode UV-visible

#### 2.1.1. Caractérisation de PVC par spectroscopie IRTF

Dans une première étape, nous avons vérifié l'existence des bandes d'absorption IR caractéristiques du PVC en le comparant au spectre de référence de **Aldrich** (2006) particulièrement dans la région 600-700  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 11). En effet, c'est dans cette région, que figurent les trois vibrations d'élongation de la liaison C-Cl. Ces bandes sont situées à 684, 636 et 610  $\text{cm}^{-1}$  selon **Aldrich**. Elles sont clairement mises en évidence sur la Figure 11, ce qui confirme que notre matériau est bien du PVC.

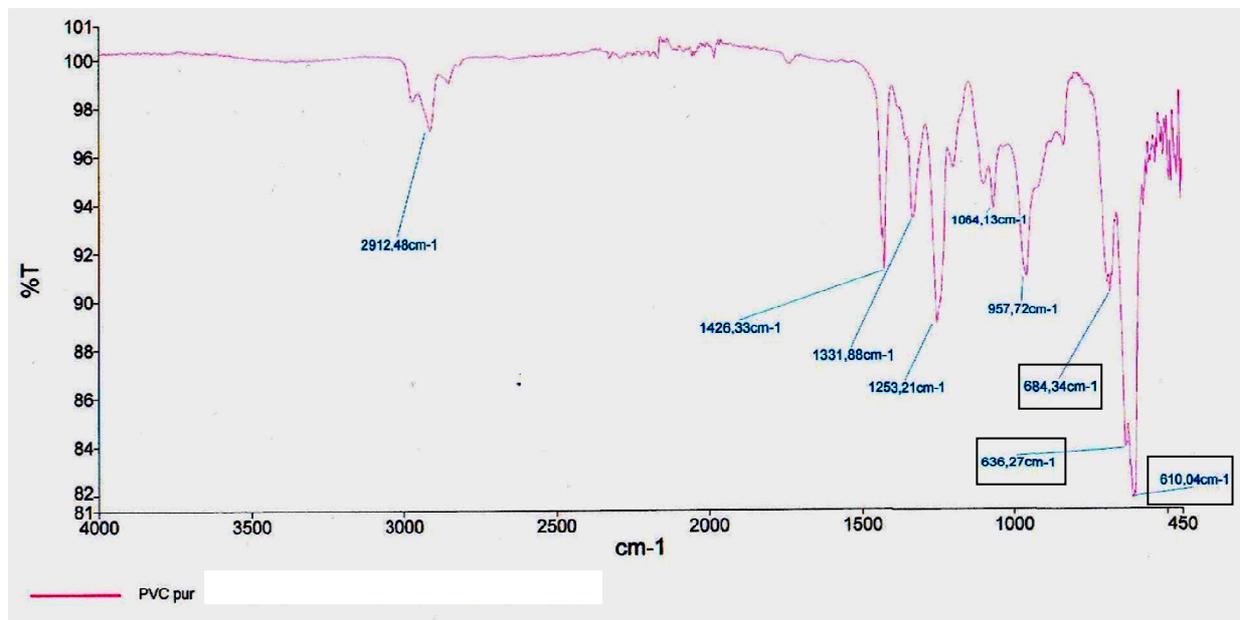


Figure 11 : Spectre IR de film de PVC pur et bandes d'absorption caractéristiques de la liaison C-Cl.

#### 2.1.2. Caractérisation de DEHP par spectroscopie IRTF

En comparant les spectres IR du PVC pur et du PVC plastifié 30% DEHP, nous avons pu identifier les bandes caractéristiques de DEHP (Figure 12).

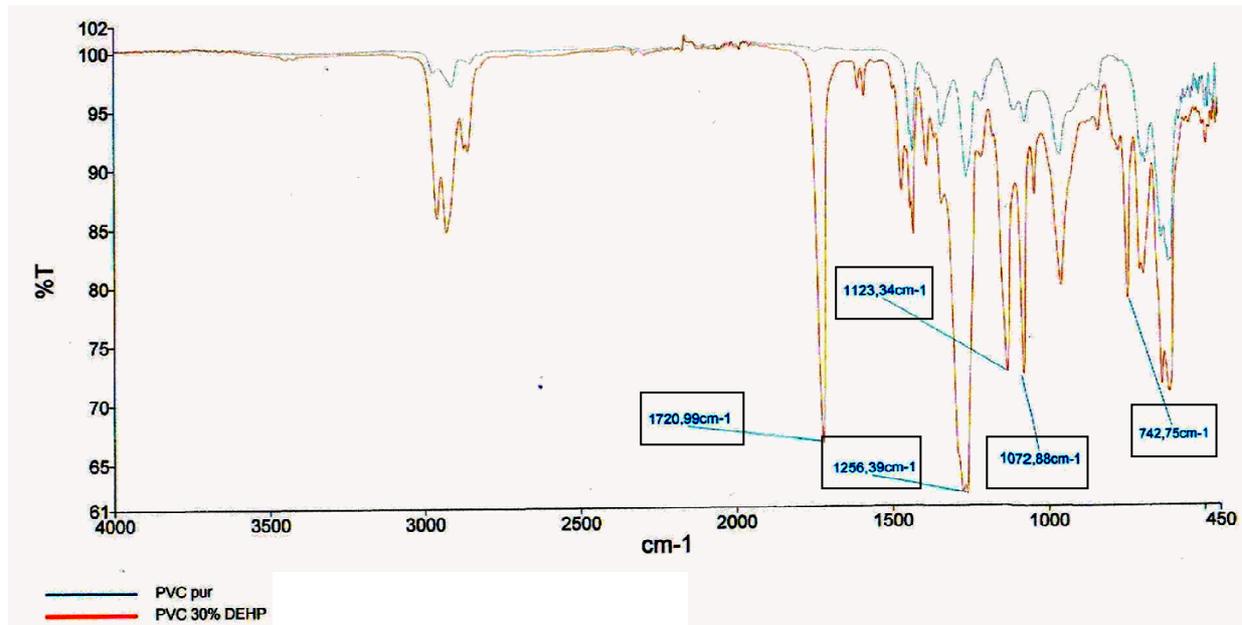


Figure 12 : Spectres IR du PVC pur et du PVC plastifié 30% DEHP avec les bandes caractéristiques de DEHP.

Tableau XIV : Identification des bandes IR d'absorption du plastifiant DEHP (Tabb et Koenig, 1975)

Fréquences (cm-1)	Attributions
1720	élongation (C=O)
1256	élongation (C-O)
1123	élongation (C-O)
1072	élongation (C-O)
742	déformation CH hors du plan

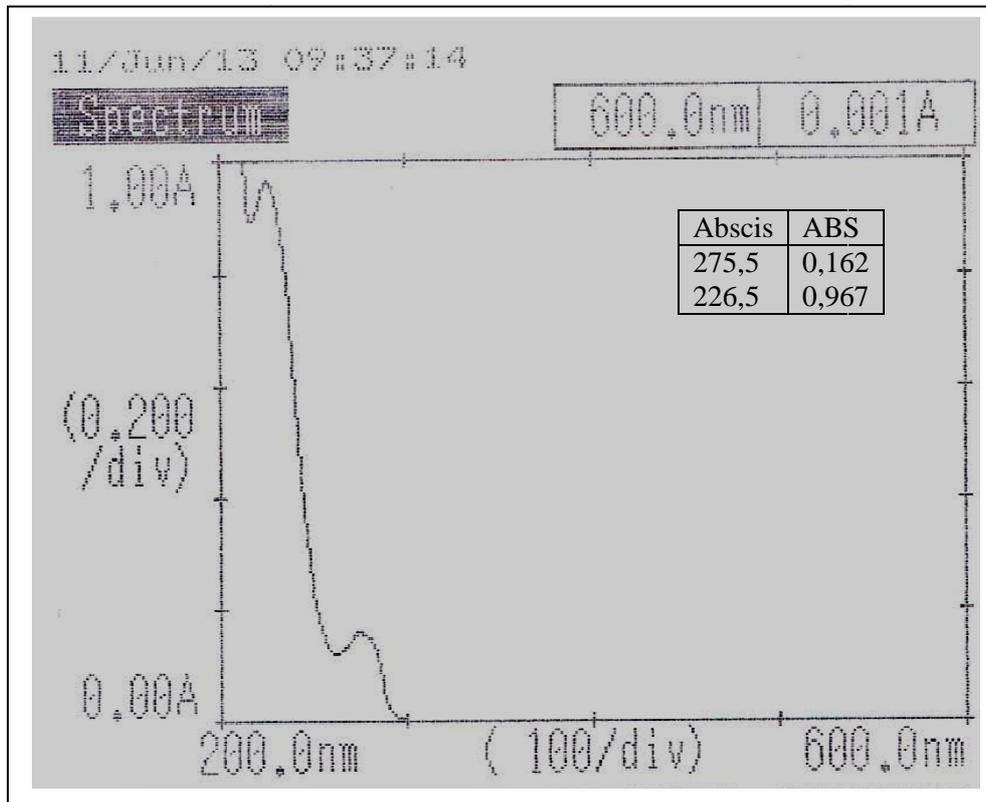
Ces attributions ont été faites en se référant aux travaux de **Tabb** et **Koenig** menés sur un PVC plastifié par le DEHP.

Nous retrouvons, dans notre échantillon de PVC plastifié 30% DEHP la plupart des bandes du plastifiant DEHP identifiées par **Tabb** et **Koenig** en 1975 ce qui confirme que le plastifiant est bien le DEHP.

### 2.1.3. Analyse du DEHP par la spectroscopie dans l'UV-Visible et validation de la méthode.

#### 2.1.3.1. Le choix de longueur d'onde

Les résultats obtenus par le balayage UV sur les quatre solutions sont représentés par la figure 13.



**Figure 13 : Analyse de DEHP par UV-visible**

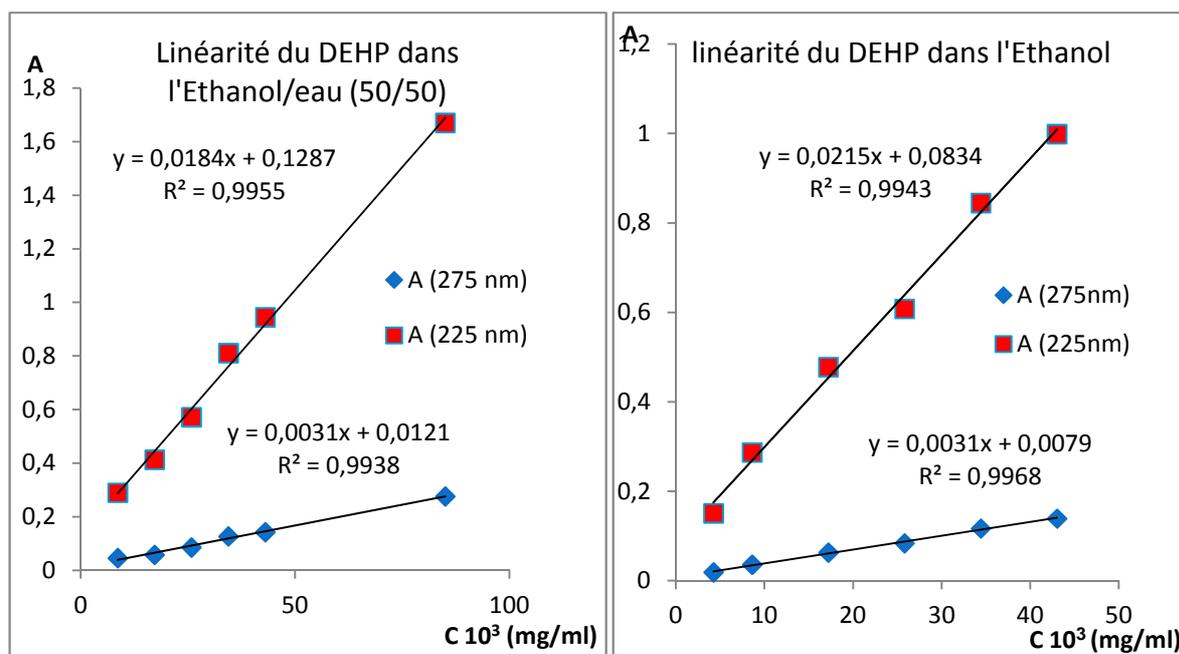
Le même spectre a été obtenu pour les deux solutions 1 et 2, il présente deux maximums d'absorption à  $\lambda_{\max} \approx 225\text{nm}$  et  $\lambda_{\max} \approx 276\text{nm}$  voir la figure, et aucune absorption n'est observée pour les deux solutions 3 et 4 aux longueurs d'ondes spécifiques au DEHP.

- Les deux extractions à reflux effectuées sur le film en PVC vierge dans les deux milieux étudiés n'ont montré aucune absorbance, **ceci prouve que la résine étudiée est une matière première pure** ;
- Les deux maximums d'absorptions observés peuvent être choisis pour l'analyse du DEHP dans les deux milieux étudiés ;
- La méthode est donc spécifique pour une étude de la migration du DEHP à partir du PVC.

### 2.1.3.2. Linéarité de la méthode

Les résultats des absorbances aux deux longueurs d'ondes fixées (225 et 275nm) pour les différentes concentrations de la gamme sont reportées dans les tableaux A1 et A2 en annexe A.

Les résultats trouvés ont permis de tracer les courbes (figures 14) des absorbances en fonction des concentrations.



**Figure 14 : Linéarité du DEHP dans les deux milieux simulants d'aliments**

Les graphes des absorbances en fonctions des concentrations dans les deux milieux, sont des droites linéaires de type  $y = A x + B$ , ce qui est en corrélation avec la loi de Beer Lambert.

Les coefficients de corrélation proche de 1 confirment la **bonne linéarité** de la méthode dans le domaine des concentrations choisies.

### 2.1.3.3. Sensibilité de la méthode

La méthode proposée ayant pour objectif la quantification du DEHP qui migre à partir du plastique tel le PVC, ce dernier peut se retrouver à l'état de trace ; il est donc intéressant d'étudier la limite de détection (la plus petite quantité qui peut être détectée et quantifiée).

A des concentrations inférieures à  $4 \cdot 10^{-3}$  mg/ml, les valeurs des absorbances ne sont plus significatives ; la concentration limite retenue dans les deux milieux de simulation est donc :  $C_{\text{limite}} \sim 4 \cdot 10^{-3}$  mg/ml. Cette méthode est donc sensible et permet de doser le DEHP à l'état de traces.

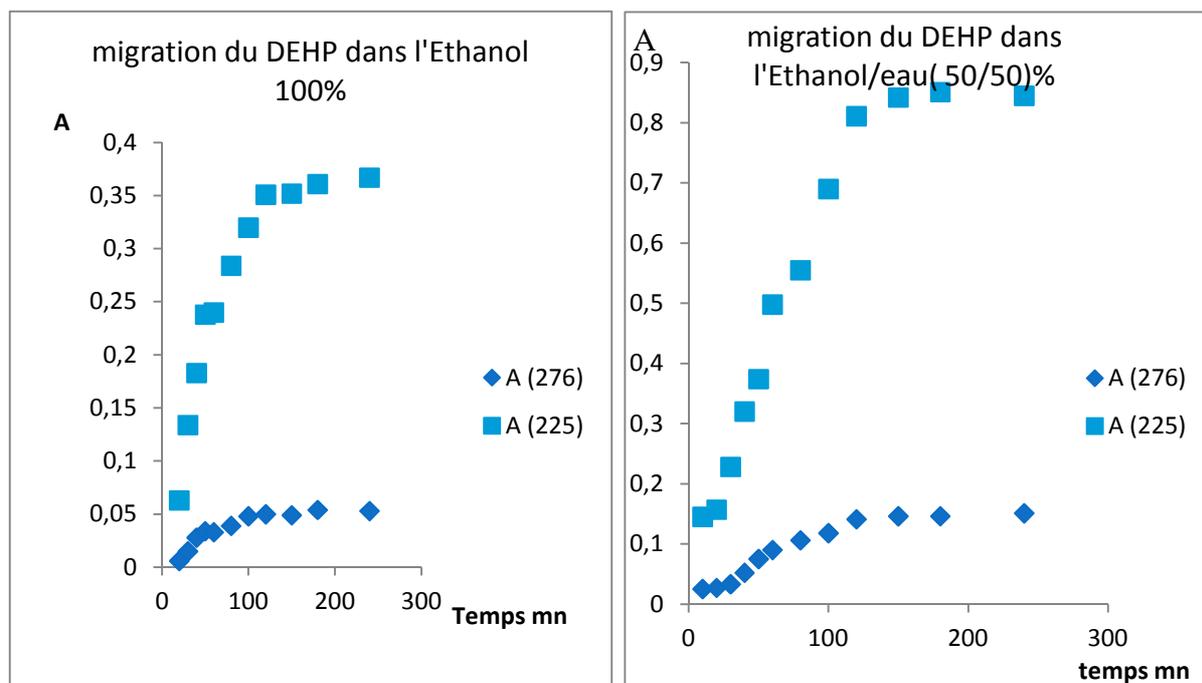
**Conclusion :**

Les résultats obtenus de l'étude des différents paramètres de validation montrent :

- Une bonne spécificité
- Une bonne linéarité
- Une bonne sensibilité

Elle est donc fiable et peut être proposée pour le suivi de la migration du DEHP à partir du PVC dans les milieux simulateurs d'aliments.

La méthode spectrométrique FTIR va permettre de vérifier la diffusion du DEHP à partir du film plastique en PVC et la spectrométrie UV- visible va confirmer sa présence dans les milieux simulateurs.

**2.2. Résultats de l'étude de la migration du DEHP****2.2.1. Essais de 2h à 70°C par UV-visible**

**Figure 15 : Cinétique de migration du DEHP par spectrométrie UV-visible**

L'absorbance étant proportionnelle à la masse du DEHP contenue dans 10 ml du milieu simulateur, une représentation graphique des absorbances en fonction du temps de contact a été réalisée (figures 14).

La figure montre que la migration de DEHP dans les deux milieux augmente en fonction de temps jusqu'à atteindre une valeur maximale (0,3577 dans éthanol absolu, 0,8372 dans éthanol 50% sur la longueur d'onde 225 nm et 0,0515 dans éthanol absolu, 0,146 dans

éthanol 50 % sur la longueur d'onde 276 nm) puis elle se stabilise. Nous remarquons que la vitesse de migration est plus rapide dans le milieu éthanol absolu.

Le calcul de la masse qui a diffusé est déterminé à partir des équations de Beer Lambert liant l'absorbance à la concentration vérifiée par l'étude de la linéarité de la méthode ; la masse limite qui a diffusé correspond à la valeur limite moyenne des absorbances relevées entre 2h et 4h de contact ; les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XV :

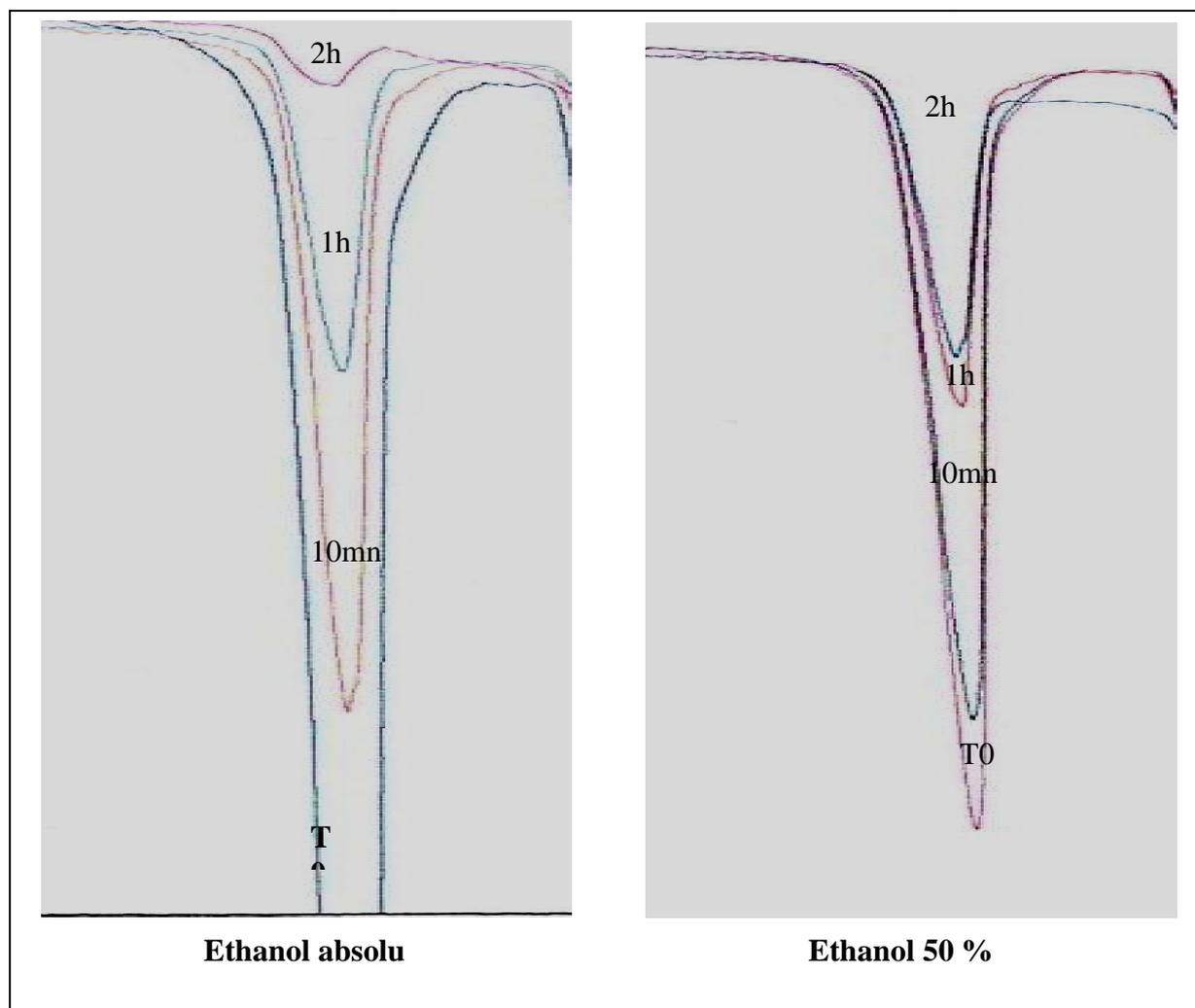
**Tableau XV : Résultats de migration obtenus par UV-visible dans les deux milieux**

	Longueur d'onde (nm)	$A_{\text{moy } \infty}$	$m_{\infty}$ (mg)	$m_0$ (mg)	% migration	% moyen de migration
Ethanol 100%	225	0.3577	13.08	16.38	79.85 %	85.20 %
	276	0.0515	13.08	16.38	90.55 %	
Ethanol 50%	225	0.8372	3.94	19.08	20.65 %	22.01 %
	276	0.146	4.46	19.08	23.37%	

Comme les résultats le montre clairement, la migration dans le milieu éthanol 100 % est beaucoup plus importante que dans le milieu éthanol 50 %.

### 2.2.2. Essais de 2h à 70°C par FTIR

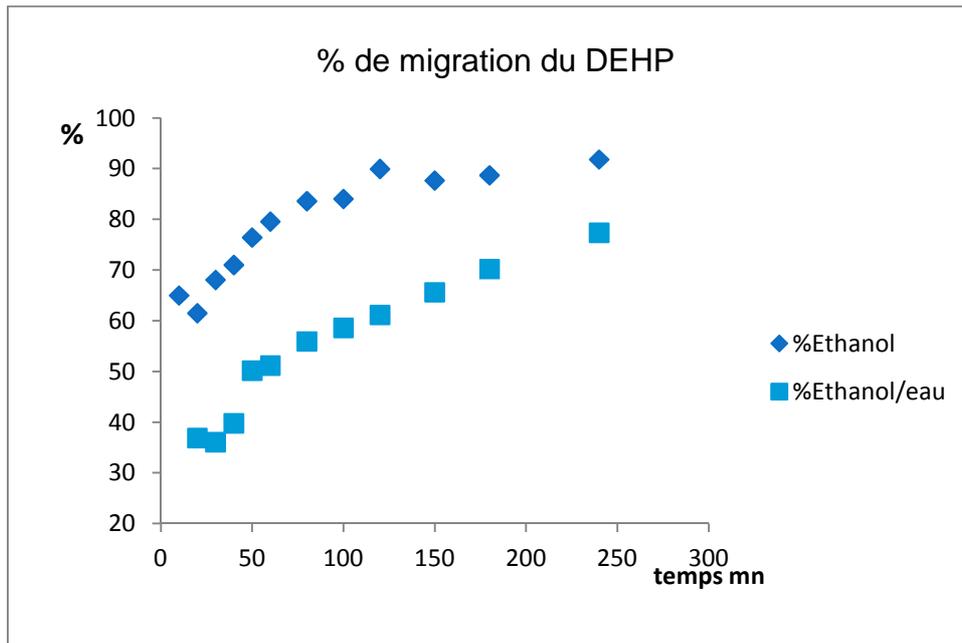
Les films, après étude cinétique, ont été analysés par FTIR ; Pour le suivi de la migration du DEHP ; Parmi l'ensemble des bandes d'absorption du DEHP préalablement identifiées sur les spectres IR du PVC 30% DEHP, nous avons choisi de suivre la bande la plus intense, située à  $1720 \text{ cm}^{-1}$ , la surface de la bande a été relevée avant et après la mise en contact du film avec les milieux simulateurs. La variation représentera la quantité de DEHP qui a migré. La Figure 16 montre la diminution de cette bande dans les deux milieux pendant 2h à 70°C.



**Figure 16 : Diminution de la bande 1720 dans les films en PVC 30% DEHP dans l'éthanol absolu et éthanol 50 % (les spectres originaux sont en annexes)**

La figure montre que la diminution de la bande est en fonction de temps dans les deux milieux mais elle est plus intense et plus rapide dans le milieu éthanol absolu où nous observons une diminution plus de la moitié au bout de 10 mn et une disparition au bout de 2h.

Les résultats des surfaces en fonction du temps de contact dans les deux milieux simulateurs et les % de migration du DEHP sont résumés dans les tableaux C1 et C2 en annexe C. Une représentation graphique du % de migration du DEHP en fonction du temps dans les deux milieux simulateurs est donnée par les figures 17.



**Figure 17: Cinétique de migration de DEHP dans les deux milieux éthanol absolu et éthanol 50% (2h/ 70°C).**

La figure montre que la migration augmente en fonction de temps de contact dans les deux milieux mais elle est plus rapide et plus intense dans le milieu éthanol absolu. En effet au bout de 20 mn de contact nous avons enregistré un taux de migration de 61.53 % dans l'éthanol absolu contre 36.92 % dans l'éthanol 50%. A 1 heure de contact le taux de migration a atteint 79.59% dans l'éthanol absolu et 51.22 % dans l'éthanol 50 %. A 2heures de contact le taux de migration atteint 89.97 % dans éthanol absolu contre 61.18 % dans l'éthanol 50 %.

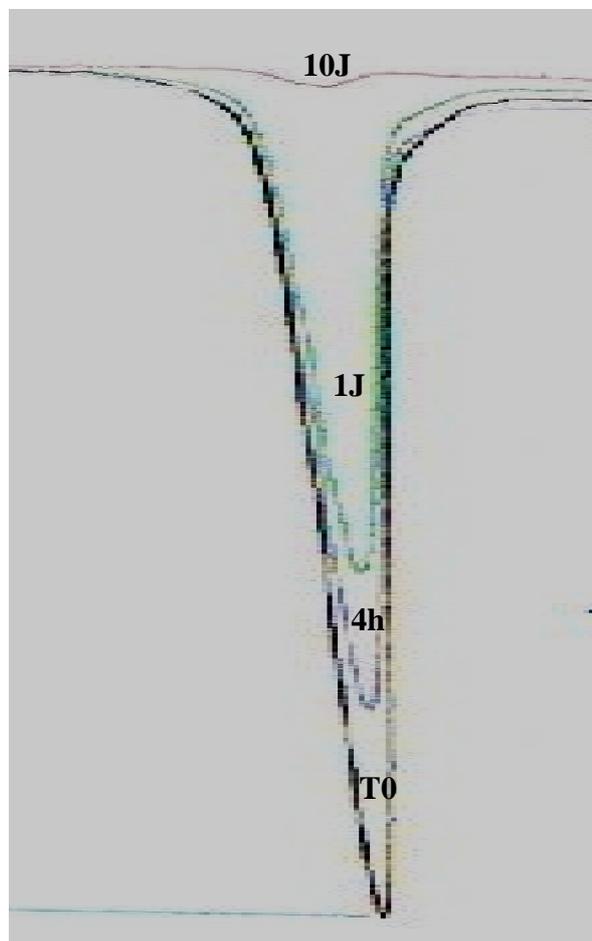
- **Taux de migration :** Le tableau suivant donne une valeur moyenne limite des pourcentages de migration du DEHP à partir du PVC dans les deux milieux simulateurs correspond au % noté entre 2h et 4h de contact dans les deux milieux ;

**Tableau XVI : les pourcentages de migration obtenus par IRTF dans les deux milieux à 70°C/2h.**

	% migration
Ethanol absolu	89.56 %
Ethanol 50 %	66.75 %

### 2.2.3. Essais de 10 jours à 50°C par FTIR

L'analyse des films avant et après la migration dans l'éthanol absolu à 50 °C pendant 10 jours par IRTF a donné le résultat suivant :



**Figure 18 : Diminution de la bande 1720 dans les films en PVC 30% DEHP dans l'éthanol absolu à 50°C pendant 10 jours (le spectre original est en annexe).**

Comme le montre clairement la figure, il y a une disparition totale de pic au bout de 10J et une diminution intense et rapide en fonction de temps. Au bout d'une journée il y a une disparition presque de la moitié de pic.

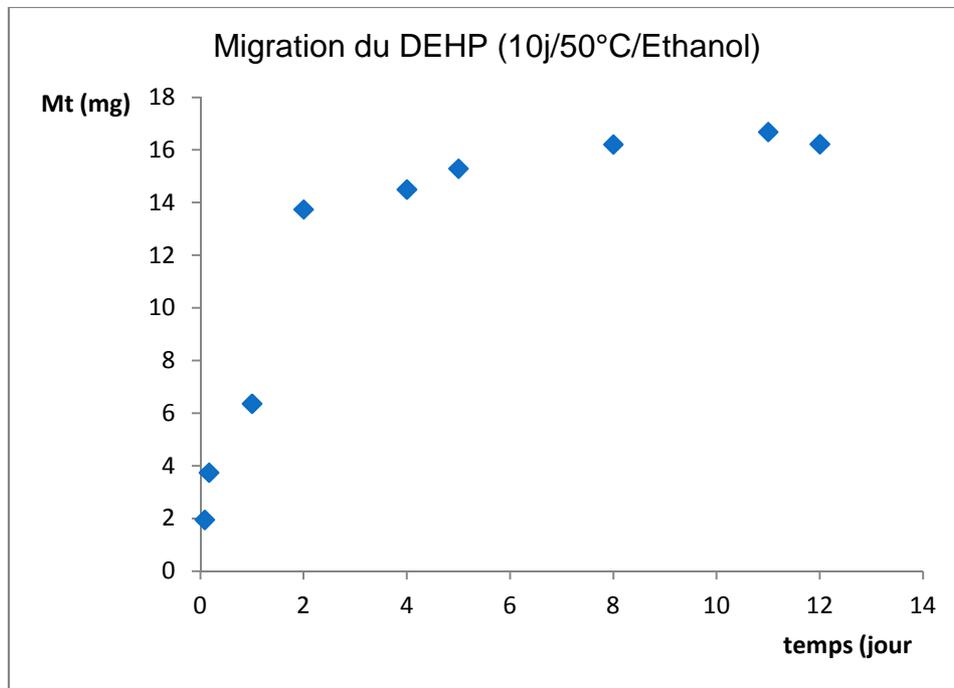
Les résultats des surfaces en fonction du temps de contact et la masse migrée du DEHP sont résumés dans le tableau D en annexe D.

- **Taux de migration** : Les taux de migration obtenu sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau XVII : les pourcentages de migration obtenus par IRTF dans le milieu éthanol absolu à 50°C/10J.**

Ethanol absolu	Taux de migration de DEHP à 50°C (essai de 10jours)	
	4 heures	10 jours
	20 %	90.52 %

La cinétique de migration pendant 10 jours/50 °C/éthanol absolu, est représenté par la figure suivante :



**Figure 19: Cinétique de migration du DEHP (10J/50°C/Ethanol absolu) par FTIR.**

La figure montre que migration accroît en fonction de temps mais elle est beaucoup plu importante aux premiers temps de contact ; au bout d’une journée (1J) nous avons enregistré une migration de 6.36 mg puis elle double au bout de deuxième journée (2J) où elle atteint une valeur de 13.74 mg. A dix jour (10J) la migration se stabilise à une valeur de 16.68 mg.

---

# *DISCUSSION*

---

## I. Discussion des résultats de l'étude toxicologique

La physiologie de la fertilité chez les mammifères est très sensible aux perturbations de l'organisme par des agents exogènes (Jegou, 1996). Les phtalates, particulièrement le DEHP, sont des perturbateurs endocriniens et classés comme de véritables agents toxiques préoccupants touchant la fertilité (INSERM, 2011).

Le DEHP est surtout étudié pour sa toxicité sur la fonction de reproduction mâle et le développement de cette fonction au cours de la grossesse. Ce point est celui qui suscite le plus de débat et d'effervescence, soulevant un problème majeur de santé publique, en raison du large champ d'utilisation de cette molécule.

En 2011, l'INSERM a indiqué dans son rapport d'expertise collective sur les perturbateurs endocriniens « reproduction et environnement », que les périodes d'exposition au DEHP les plus sensibles sont les expositions lors de la vie intra-utérine et néonatale, et que les effets d'une exposition *in utero* et pendant la lactation sont supérieurs à ceux induits uniquement pendant la gestation. Par ailleurs, il a été démontré par, Stroheker et al., en 2006, que le DEHP passe efficacement la barrière placentaire et atteint les gonades chez le rat en administrant du DEHP radioactif par voie orale aux rates gestantes.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons enregistré une diminution de 52,8 %, statistiquement significative, du taux de la testostérone chez les animaux exposés à 1000 mg/kg pc/j et une diminution bien que statistiquement non significative de 34%, chez les animaux exposés à 100 mg/kg pc/j. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de l'étude histopathologique des coupes des testicules qui ont montré une légère diminution de nombre des cellules de Leydig chez les traités par 100 mg/kg pc /j, par rapport aux témoins ce qui explique la diminution de la testostérone, et une diminution drastique du nombre avec une forte altération de ces cellules, agrégation et hyperplasie phénomenale chez les traités par 1000 mg/kg pc/j. Les mécanismes responsables de cette diminution de testostérone ont été décrits dans plusieurs études et des résultats concordants décrivent une diminution de l'expression des enzymes de transport du cholestérol et de biosynthèse des hormones stéroïdes (INSERM, 2011).

Ces effets sont rapportés de manière quasisystématique chez le rat. Ainsi, Munczynski, (2011), indique que, l'exposition des rates pendant la phase de gestation au DEHP (pour des doses allant de 100 à 1000 mg/kg/jour) entraîne une diminution de la production de testostérone en fin de vie fœtale et l'agrégation des cellules de Leydig sous forme de clusters de cellules au centre du testicule. Culty, (2009) a constaté que cette

agrégation peut être accompagnée d'une diminution du nombre total de cellules de Leydig, ainsi que d'une hyperplasie de ces cellules. Chez le rat de lignée Wistar, l'administration de 150 mg/kg/j de DEHP à la femelle gestante ne diminue pas de manière significative la production de testostérone durant la vie fœtale (**Drake et al.**, 2009 ; **Martino-Andrade et al.**, 2009). En revanche, la dose de 750 mg/kg/j de DEHP administrée pendant la gestation diminue significativement le taux de la testostérone fœtale chez le rat de lignée Long-Evans (**Lin et al.**, 2008). **Vo et al.**, (2009a) indiquent un effet semblable chez le rat de lignée Sprague-Dawley lors d'un gavage au DEHP (500 mg/kg/j) pendant la gestation. **Drake et al.**, (2009) indiquent que des doses plus faibles de DEHP (dès 117 mg/kg/j) diminuent également la sécrétion de testostérone chez le rat Sprague-Dawley. D'autres auteurs (**Akingbemi et al.**, 2001) ont gavé des rates de lignée Long Evans pendant la gestation (du 12<sup>e</sup> au 21<sup>e</sup> jour) avec 100 mg/kg/j de DEHP et observent une diminution de testostéronémie des mâles nés de ces animaux. Il nous semble important de signaler que certains auteurs rapportent un effet du DEHP dès 100 mg/kg/j (**Vo et al.**, 2009a) et d'autres auteurs n'indiquent pas d'effet à une dose proche (**Martino-Andrade et al.**, 2009). La diminution de taux de la testostérone à 100 mg/kg/j chez le Wistar, pourrait aussi être due aux effets de stress. En effet, **Drake et al.**, (2009) ont identifié le stress comme paramètre pouvant accroître la sensibilité *in utero* aux phtalates, dans cette étude, les auteurs ont gavé des rates gestantes lignée Wistar, avec 100 mg/kg/j de DBP accompagné d'un élément de stress, le résultat a été une amplification des effets notamment la diminution de taux de la testostérone, ce qui suggère que le stress pourrait sensibiliser à l'action des phtalates.

Il semble donc largement prouvé que le DEHP administré aux rates gestantes inhibe l'activité stéroïdogène du testicule fœtal dans diverses lignées de rats, mais l'effet à faible dose (100 mg/kg/j) varie surtout en fonction de la lignée de rat, la lignée Sprague-Dawley apparaît comme plus sensible que la lignée Wistar.

Les conséquences de la diminution de taux de la testostérone fœtale (responsable de la masculinisation et de différenciation des organes reproducteurs) ont été clairement visibles chez les rats traités. Ainsi, nos résultats montrent une diminution de 25,44%, statistiquement significative de la distance anogénitale absolue (DAG) et une diminution drastique, hautement significative, de 34% de la DAG rapportée au poids corporel chez les mâles exposés à la forte dose (1000 mg/kg/j), et de légère variation non significative chez les traités par 100mg/kg/j, à savoir une augmentation de 5,8% de la DAG absolue et une diminution de 0,19% de la DAG rapportée au poids corporel. Des résultats similaires sont rapportés d'une manière quasisystématique par les auteurs. Ainsi, une diminution marquée de la DAG, à des dose

supérieures à 250 mg/kg/j, est décrite dans les jours qui suivent la naissance par plusieurs auteurs (**Gray et al.**, 2000 ; **Borch et al.**, 2004 ; **Anderson et al.**, 2006 ; **Lin et al.**, 2008 ; **Saillenfait et al.**, 2008 ; **Drake et al.**, 2009 ; **Gray et al.**, 2009 ; **Lin et al.**, 2009 ; **Martino-Andrade et al.**, 2009 ; **Saillenfait et al.**, 2009 ; **Vo et al.**, 2009a).

Le DEHP a pour effet de réduire la distance anogénitale (environ de 30%) à une dose de 750 mg/kg pc/j (**Munczynski**, 2011). Il a été démontré par **Saillenfait (2010)** que la DAG est diminué par le DEHP à des doses qui concordent généralement avec les effets observés sur la sécrétion de testostérone chez le rat, et là nous rappelons que nous avons enregistré une diminution de 34 % de taux de la testostérone mais statistiquement non significative, parallèlement une légère augmentation de 5,8 % (aussi non significative statistiquement) de la DAG à 100 mg/kg/j chez le Wistar. Des effets similaires ont été rapportés par **Anderson et al.**, (2006), les auteurs ont observé une augmentation non significative de la DAG au 21JPN chez le rat mâle né des mères exposées au DEHP pendant la gestation et la lactation à une dose de 135 mg/kg/j, pour ces auteurs, cette effet est indépendant de traitement. **Martino-Andrade et al.** (2009) ont indiqué que la dose de 150 mg/kg/j de DEHP n'a pas d'effet sur la DAG chez le rat Wistar. Il nous semble que c'est important de signaler que nous avons remarqué une corrélation positive entre le poids corporel et la DAG, ce qui indique que ce paramètre n'est pas affecté d'une manière directe mais il dépend du développement totale de corps.

Un autre paramètre qui semble fortement altéré par le DEHP est le poids testiculaire, en effet nos résultats montrent une diminution de 18,84%, de poids absolu, statistiquement significative et une diminution 3,11% de poids relatif, statistiquement non significative, chez les mâles exposés à la forte dose (1000 mg/kg/j). Ce résultat concorde parfaitement avec les résultats de l'histopathologie qui ont montrés une diminution drastique de nombre et de la taille des cellules de Sertoli. Cette diminution de la prolifération des cellules de Sertoli semble être la cause de la diminution du poids testiculaire lors d'une exposition aux phtalates pendant la gestation rapportée par de nombreux auteurs. En effet, les cellules de Sertoli sont le type cellulaire majoritaire dans le testicule en fin de vie fœtale. (**Fisher et al.**, 2003 ; **Jonhson et al.**, 2008 ; **Boekelheide et al.**, 2009). Cet effet est rapporté d'une manière quasystématique par les auteurs mais sans prendre en considération le poids relatif qui ne semble pas affecté d'une manière significative !!Ainsi, **Scott et al.**, (2008), ont démontré que la prolifération des cellules de Sertoli est réduite en réponse à une exposition aux phtalates *in utero*. **Fisher et al.**, (2003) ont rapporté une chute importante, de l'ordre de 50 %, du nombre de cellules de Sertoli en fin de gestation chez la lignée Wistar gavé au DBP (500 mg/kg/j).

Etonnement, à 100 (mg/kg/j) nous avons enregistré une augmentation significative de 27 % de poids absolu et une augmentation nos significative, de 3,51 % de poids relatif des testicules. Cette augmentation pourrait être expliquée par la hausse de volume des cellules de Leydig montrée par les coupes histopathologiques des testicules des rats exposés à 100 mg/kg/j. **Culty et al.**, (2008) ont indiqué une hausse de volume leydigien à 234 mg/kg/j de DEHP. **Anderson et al.**, (2006) ont rapporté une augmentation de poids testiculaires à une dose de 135mg/kg/j, pour ces auteurs cet effet est indépendant de traitement. L'augmentation de poids corporel observé à cette dose pourrait être aussi la cause de l'augmentation de poids testiculaire puisque une corrélation positive a été observée entre les deux.

Les cellules germinales, comme l'ont bien montré les résultats de l'étude histologique, ont connues une diminution importante de leur nombre à 1000 mg/kg/j, cette diminution est la conséquence de la diminution du nombre des cellules de Sertoli. En effet, **Ferrara et al.**, (2006) ont indiqué que les cellules de Sertoli ont pour fonction d'être un support du développement des cellules germinales ce qui explique la réduction du nombre de ces dernières observée durant la vie fœtale, comme à l'âge adulte. Selon les mêmes auteurs, la diminution du nombre de cellules germinales (précurseurs de la spermatogénèse adulte) pendant la vie fœtale, permet d'étayer l'hypothèse d'une origine fœtale de la diminution de production et de la qualité spermatique observable à l'âge adulte. D'après résultats de l'étude histologique, les cellules germinales montrent une petite différenciation. Ceci pourrait s'expliquer selon certains auteurs par une puberté précoce (**Culty et al.**, 2008). 100 mg/kg/j de DEHP n'a aucun effet observable sur les cellules germinales. **Fisher et al.**, (2003) ont indiqué que doses supérieures ou égales à 100 mg/kg/j sont nécessaires pour altérer les cellules germinales.

Quant aux poids absolus et relatifs des organes foie et reins, nos résultats ne montrent pas une variation significative chez les traités par rapports aux témoins. Des résultats similaires ont été obtenus par **Anderson et al.**, (2006), ces auteurs n'ont pas observé d'effet significatif sur les poids de foie et des reins chez les rats nés des mères exposées au DEHP (135 mg/kg/j et 450 mg/kg/j) pendant la gestation et la lactation. Une étude a été publiée en 2007 par **Grande et al.**, sur l'effet de faibles et fortes doses de DEHP chez les rates Wistar exposées par gavage du jour 6 de gestation au jour 21 postnatal (sevrage), qu'elle que soit la dose, aucun effet n'est observable sur le poids des différents organes analysés (foie, rein).

Toute fois de légères variations ont été enregistrées à savoir une légère augmentation de poids absolus de foie et des reins chez les traités par la faible dose (100 mg/kg/j). Ceci

pourrait être expliqué par le fait que le foie est le centre de métabolisme et le rein le centre d'élimination. En effet, d'après **ATSDR** (2002) et **ANSES** (2012), les données expérimentales recueillies chez l'animal indiquent que les résidus de DEHP (DEHP inchangé + métabolites) sont principalement localisés dans le foie et le rein (organes cibles). **Srivastava et al.**, (1989) ; **Stroheker et al.**, (2006) indiquent que, des résidus de DEHP ont été détectés dans le foie des fœtus de rats dont la mère avait été traitée par gavage durant la gestation, démontrant la capacité du DEHP à traverser la barrière placentaire. Au niveau fœtal, l'exposition *in utero* au DEHP (25 et 100 mg/kg/jour) de souris entre 11 et 19 de gestation entraîne une augmentation de l'hépatostéatose (rétention des triglycérides dans les vacuoles hépatocytaires) (**Maranghi et al.**, 2010). Au niveau rénal, une augmentation du poids du rein est observée après des expositions chroniques au DEHP par voie orale chez le rat (**ANSES**, 2012).

En ce qui concerne le poids corporel des ratons à la naissance (1JPN) nos résultats montrent une légère diminution chez les traités par les deux doses par rapport aux témoins, en effet nous avons enregistré :  $5,60\text{g} \pm 0,12$  et  $5,22\text{g} \pm 0,14$  chez les traitées par la première et la deuxième dose respectivement contre  $5,95\text{g} \pm 0,22$  chez les témoins, toutefois cette diminution n'est pas significative statistiquement. **Saillenfait et al.**, (2009) ont rapporté des résultats similaires, diminution du poids des ratons portés par des mères ayant reçu 500 et 750 mg/kg/j.

Cependant le développement des ratons pendant la lactation a été fortement perturbé chez les traités par rapport aux témoins. En effet au 21JPN nous avons enregistré une augmentation de 21,82 % chez les traités par 100 mg/kg/j et une chute de poids de 7,77 % chez les traités par 1000 mg/kg/j. Des résultats similaires ont été rapporté par **Anderson et al.**, 2006 au 21JPN, après une exposition *in utero* et pendant la lactation, les auteurs ont observé une augmentation de poids des ratons à une dose de 135 mg/kg/j et une diminution à une dose de 450 mg/kg/j. Cependant, dans ce sens, les auteurs rapportent des résultats différents voire contradictoires, entre ceux qui rapportent un retard de croissance et de développement et ceux qui suggèrent un lien entre l'exposition aux phtalates et l'obésité. EN effet, **Saillenfait et Laudet-Hesbert** (2005) ont indiqué que l'exposition au DEHP provoque un retard de développement et de croissance. En opposition, **Saillenfait et al.**, (2009) ont rapporté une augmentation de poids dose dépendante (corrélation positive entre la dose et le poids corporel) pendant la lactation. Récemment, certains auteurs suggèrent un lien entre l'obésité et l'exposition aux phtalates, mais c'est une hypothèse non encore démontrée.

Dans nos conditions expérimentales, il nous semble que le paramètre de l'évolution pondérale des rats est difficile à l'associer uniquement au DEHP puisque plusieurs autres facteurs l'influencent, en effet, l'augmentation de poids chez les traités pourrait être expliquée par la diminution de la taille des portées. Ainsi, nous avons remarqué une corrélation positive entre la taille de portée et poids corporel des rats, chez les portées de petite taille (nombre de raton est petit), c'est le cas des traités, à 100 mg/kg/j nous avons eu une taille de portée 8 rats  $\pm$  3 et à 1000 mg/kg/j on a eu une diminution drastique 5 rats  $\pm$  2 nous avons enregistré un développement croissant de poids corporel des rats (un gain de poids important) par rapport aux témoins qui ont une taille de portée de 10 rats  $\pm$  2. Ceci nous semble évident puisque quand la taille de portée est réduite, il y'aura pas une compétition entre les rats pour s'allaiter et chacun peut avoir une quantité de lait suffisante, contrairement à ce qui se passe quand la taille des rats est grande, c'es le cas des témoins où nous avons remarqué que certains rats sont mis à l'écart (nous avons observé certains rats à estomac vide). La chute de poids observée chez les traités pas 1000 mg/kg/j après le 14JPN, pourrait être due aux effets de stress qui favorise l'effet de DEHP, puisque ce virage de poids à été observé uniquement dans une seule portée.

En ce qui concerne les différents résultats préliminaires, nous avons enregistré chez les traités par 1000 mg/kg/j, un retard important à concevoir, une gestation prolongée ( $27j \pm 2,3$  contre  $21,4j \pm 0,24$  et  $21,66j \pm 0,66$  chez les traitées par la première dose et les témoins respectivement) et des signes de tératogénicité ; une mortalité au 18 jours de gestation dont l'autopsie a révélée une mortalité embryonnaire et dix (10) nouveaux nés mort. A 100 mg/kg/j nous n'avons observé aucun signe de toxicité générale à part la mortalité de trois (3) nouveaux nés. Aucune mortalité n'est observée chez les témoins.

Un taux de gestation de 100% à été observé chez les témoins et les traitées par 1000 mg/kg/j, 83% chez les traitées par 100 mg/kg/j.

Ces résultats sont en parfait accord avec ce qui a été rapporté dans la littérature, en effet, d'après **INSERM** (2011), en 2009, une équipe japonaise a utilisé des rats Sprague-Dawley ayant reçu oralement 300, 1 000 mg/kg/j de DEHP, deux semaines avant l'accouplement jusqu'au jour 7 de gestation pour évaluer l'effet sur la fertilité et le début du développement. Ils ont montré que seule la forte dose de 1000 mg/kg/j induisait un retard à concevoir et des mortalités embryonnaires. Les doses inférieures n'entraînent aucun effet sur la fertilité ou le développement embryonnaire. Le protocole de l'OCDE indique dans l'article 26 que le traitement des femelles avant accouplement a pour but d'identifier d'éventuels effets nocifs sur la cyclicité et la fertilité. Une étude de tératogénicité d'après **ECB** (2008), réalisée avec

des rats exposés par gavage à des doses allant de 333 à 1120 mg/kg/j pendant la gestation montre retard à la mise bas (gestation prolongée) chez les mères exposées aux doses de 750 et 1120 mg/kg/j de DEHP. Une gestation prolongée a été également rapportée par **Saillénfait et al.**, (2008 et 2009) après une exposition des mères gestante à 750 mg/kg/j de DEHP. **Saillénfait et Laudet-Hesbert** (2005) ont indiqué que de nombreuses études chez le rat et la souris montrent que l'ingestion de DEHP pendant la gestation provoque des morts embryonnaires et un retard à la mise bas. En 2009, **Saillénfait et al.**, ont rapporté une importante mortalité embryonnaire à 750 mg/kg/j. Dans le même sens, **Gray et al.**, (2006) ont indiqué que le dose de 500 mg/kg/j de DEHP provoque une augmentation de la mort *in utero* des fœtus. Selon l'**ANSES** (2011) une étude de tératogénicité réalisée avec des rats Wistar exposés par gavage à des doses de 40, 200 et 1000 mg/kg/j pendant la jours la gestation montre des effets sérieux sur la descendance (mortalité embryonnaire importantes (40%) et baisse du poids fœtal) à la dose la plus forte.

En fin, en ce qui concerne l'évolution pondérales des mères nos résultats montrent que l'exposition au DEHP durant toute la période de l'expérimentation, avant accouplement, gestation et pendant la lactation, n'a pas d'incidence significative sur les poids des traitées par rapport aux témoins. Dans ce sens, **ANSES** (2011) indique que l'exposition au DEHP pendant la gestation n'a aucun effet néfaste chez les mères. Cependant des variations bien que ne sont pas significatifs ont été observés chez les femelles exposées à 1000 mg/kg/j pendant la gestation par rapport aux témoins et aux traitées par 100mg/kg/j. Ceci pourrait être en relation avec le nombre et le poids d'embryon porté par chaque mère, comme nous l'avons déjà signalé la taille des portées et le poids des ratons à la naissance ont diminué chez les traités par 1000 mg/kg/j.

## II. Discussion des résultats de l'étude de migration

Les résultats obtenus après 2h de contact à 70°C par les deux techniques, UV et IRTF sont comparables, en effet les deux techniques ont révélé des taux de migration proches de DEHP dans les deux milieux mais il est plus important dans le milieu éthanol absolu que dans le milieu éthanol 50 %.

Dans l'éthanol absolu nous avons obtenu un taux de migration de 85,20% par l'UV et 89,56% par IRTF à 70°C pendant 2heures de contact, à 50°C pendant 10 jours l'IRTF a donné un taux de migration 90,52% atteint au bout de quatrième jours (4J). Des résultats similaires ont été rapportés par **Rahmani** (2011) dans sa thèse de magistère où elle a enregistré un taux de migration de 90 % dans l'éthanol absolu par l'UV. **Mkacher** (2012), a observé une disparition totale de la bande 1720 de DEHP après 4 jours à une température de 60°C.

Dans l'éthanol 50% le taux de migration a diminué, en effet nous avons enregistré 66,75% par IFTR et l'UV a donné une valeur de 22,01%, beaucoup plus faible que celle trouvée par FTIR, ce résultat est lié à la mauvaise solubilisation de DEHP dans ce milieu qui contient 50% de l'eau, les solutions obtenues des essais présentent une opalescence et un trouble au de la de 1h de contact à 70°C. Dans ce sens **ANSES** (2012) a indiqué que le DEHP n'est pas soluble dans l'eau, ce qui explique donc ce taux faible de migration.

Ces résultats sont dus d'une part à la température de contact (50°C et 70 °C) et d'autre part à la nature de milieu de contact (éthanol absolu et éthanol 50 %). En effet, **Zaki** (2008) indique que la température est l'un des paramètres les plus importants qui contrôle la migration. Dans ce sens nos résultats ont montré que l'évolution du taux de migration dans le même milieu (Ethanol absolu) et pour un même temps de contact est plus importante à 70°C où nous avons enregistré 89,56% qu'à 50°C où nous avons enregistré 20 % pour un temps de contact 4 heures. **Feigenbaum** et *al.*, (1993) ont indiqué que le milieu de contact et le caractère lipophile du migrant sont aussi des paramètres importants qui détermine la migration, ces auteurs ont indiqué que, même si la migration est possible dans les aliments aqueux, ils migrent davantage dans les aliments gras. **ANSES** (2012) a indiqué que le DEHP est une substance lipophile donc a plus d'affinité pour les matières grasses. Ceci explique la migration importante de DEHP dans le milieu éthanol (89 %) et sa diminution dans le milieu éthanol 50 %.

Concernant la cinétique de migration, nos résultats ont montré que cette dernière est plus importante aux premiers temps de contact puis tend vers une stabilité pour donner une

valeur limite de migration dans tous les milieux et conditions utilisés. Ceci s'explique par le fait que la migration est due à un gradient de concentration entre le liquide simulant d'aliment et le film de PVC 30 % de DEHP, jusqu'à atteindre un équilibre. Ce résultat est en corrélation avec l'approche théorique de processus de migration décrit par **Zaki** (2008).

Rappelons que le milieu éthanol absolu représente les aliments gras et l'éthanol 50% représente les aliments moyennement gras, à la lumière des résultats obtenus il est donc certains que toutes les denrées alimentaires à caractères lipophile emballées par le PVC contiennent le DEHP à des quantités importantes, d'autant plus que le conditionnement est toujours associé à de mauvaises conditions de stockage durant tout le processus de fabrication. C'est le cas par exemple du lait et des produits laitiers qui sont préparés et fermentés dans des récipients plastiques et emballés par des films plastique, sans parler des fluctuations de la température pendant le stockage et transport ou dans les frigo (qui sont la plupart du temps éteint la nuit) des alimentations générales. **INERIS** a indiqué en 2005, que la majorité des articles en matières plastiques rigides et semi rigides ou souples contiennent de DEHP. **Dargnat** (2008) a détecté  $172,7 \text{ ng.g}^{-1}$  dans le gruyère et  $105,7 \text{ ng.g}^{-1}$  de DEHP dans le camembert. Concernant les corps gras, où la migration est beaucoup plus importante comme l'ont montré les résultats, nous avons constaté que leur emballage est la plupart de temps en PET et comme nous l'avons signalé en bibliographie certains auteurs ont indiqué que le DEHP est utilisé comme plastifiant dans le PET (**Casajuana** et **Lacorte**, 2003; **Biscardi** et *al.*, 2003 **Fankhauser-Noti** et **Grob**, 2006; **Montuori** et *al.*, 2008 ; **Marie-Hélène**, 2013). **OFSP** (2012) a indiqué que le c'est au moment de mise en boîte (margarine) ou en bouteille (huiles) après une pasteurisation qu'il ya un pic de relargage. Au quel s'ajoute la migration pendant le stockage et le transport dans des conditions de température qui atteint les  $40^{\circ}\text{C}$  pour les huiles, d'autant plus que la réglementation algérienne n'exige pas leur transport dans des camions frigorifique! Les produits de biscuiterie et de boulangerie sont souvent emballés par des films en PVC comme il a été indiqué par **Amar Yahia** et *al.*, (2007), et sont souvent stocké dans de mauvaise conditions de température pendant de longue durée, particulièrement les produits importés qui ont une chaine de transport très longue. Nous sommes donc tous exposés au DEHP à travers notre alimentation.

---

# *CONCLUSION*

---

### Conclusion

Notre travail a eu pour but d'évaluer les effets toxiques pour la reproduction et de mettre en place une méthodologie analytique simple et pertinente pour le suivi de la migration du DEHP d'un film en PVC plastifié vers quelques milieux simulants de denrées alimentaires.

Dans la première partie de ce travail nous avons étudié l'effet d'une exposition *in utero* et pendant la lactation à une faible et à une forte dose de DEHP sur l'appareil reproducteur de rat mâle. Nos résultats ont montré que la forte dose altère d'une manière très importante la morphologie et la fonction des cellules testiculaires ;

L'altération des cellules de Leydig a inhibé la sécrétion de la principale hormone, la testostérone, cet effet a qualifié le DEHP de perturbateur endocrinien. Les conséquences de la diminution de cette hormone responsable de la masculinisation, ont été clairement visibles chez le rat, en effet nos résultats ont montré une diminution drastique de la distance anogénitale.

Quant aux cellules de Sertoli (support des cellules germinales), nos résultats ont montré une diminution drastique de leur nombre et de leur taille qui s'est traduite par une diminution drastique du poids testiculaire et du nombre des cellules germinales.

Concernant les cellules germinales la diminution de leur nombre pourra se traduire par une diminution de la quantité et de la qualité de sperme chez l'adulte ce qui permet d'étayer l'hypothèse d'une origine fœtale des maladies adultes (**INSERM**, 2011)

Plusieurs autres effets toxiques ont été observés à savoir : gestation prolongée, mortalité fœtale et un retard de développement et de croissance.

A la faible dose, nos résultats n'ont pas montré des effets toxiques significatifs mais il est encore incertain si les effets toxiques de DEHP sont uniquement dépendants d'une exposition à de fortes doses ou si ces effets peuvent se manifester à des doses beaucoup plus faibles chez certains animaux. Quelques travaux suggèrent, selon **INSERM**, que tel pourrait être le cas mais ceux-ci sont encore à confirmer.

Enfin la question se pose de savoir si les rats sont de bons modèles animaux pour l'étude des effets chez l'homme. Selon **INSERM**, il y a indubitablement des différences de métabolisme et de physiologie à prendre en compte pour les différentes espèces mais sans

## *Conclusion*

---

connaître les effets sur les cellules humaines correspondant aux types et stades les plus sensibles chez les rongeurs, il est difficile de se prononcer !

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons mis en place méthodologie analytique simple et pertinente pour le suivi de la migration de DEHP de PVC plastifié vers deux milieux simulants de denrées alimentaires, éthanol et éthanol eau.

Les essais de migration ont été menés à deux températures (50 et 70°C) sur des films en PVC souple à 30% et le suivi a été réalisé par deux méthodes d'analyse à savoir la spectrométrie dans l'UV-visible et la spectrométrie FTIR.

Dans l'éthanol absolu, les deux techniques ont donné des résultats très proches, en effet, l'infrarouge a révélé un taux de migration de 89.56 % contre 85,20 % par ultraviolet à 70°C pendant 2heures. A 50°C pendant dix jours, un taux de migration de 90, 52 % a été révélé par l'infrarouge.

Dans l'éthanol 50% les résultats donnés par les deux techniques divergent un peu, en effet l'ultraviolet a révélé un taux de migration de 22,01% contre 66,75% révélé par l'infrarouge. Ceci est dû à la non solubilisation de DEHP dans l'eau.

La variation du taux de migration du DEHP est fonction de la température, de la nature de migrant et de milieu et du temps de contact. En effet :

- Plus la température augmente et plus la migration augmente;
- Etant donné que le DEHP est une substance lipophile, sa migration est beaucoup plus importante dans les denrées alimentaires à caractère lipophile;
- Plus le temps de contact est long et plus la migration est importante;

les résultats obtenus par les deux techniques et dans les deux milieux laissent supposer que toutes les denrées alimentaires à caractère lipophile emballées par des emballages plastiques souples contiennent des quantités importantes de DEHP qui dépassent largement les limites fixées par la réglementation, nous sommes donc tous exposés à ce « poison migrant » à des doses qui peuvent être toxiques !

Les deux techniques proposées peuvent être donc utilisées pour le suivi de la migration de DEHP de PVC vers les milieux simulants de denrées alimentaires.

La méthode UV-visible présente un inconvénient lié à la précipitation de DEHP dans les milieux où il présente une faible solubilisation ;

## *Conclusion*

---

La spectrométrie FTIR est très intéressante pour le suivi de l'étude de migration car elle s'applique directement sur le matériau (film) à condition de trouver les vibrations les plus spécifiques à l'additif et de sécher les films pour éviter les interférences avec les vibrations du milieu simulateur.

## *Perspectives*

Pour aller plus loin dans la problématique de ce travail, il serait très intéressant de :

- ✚ Etudier les effets toxiques pour la reproduction à de très faibles doses ;
- ✚ Etudier l'effet cocktail puisque nous sommes exposés à plusieurs phtalates en même temps ;
- ✚ Faire une recherche de DEHP directement dans les aliments ;
- ✚ Estimer le niveau d'exposition du consommateur Algérien à travers le dosage des métabolites de DEHP dans les urines ;
- ✚ Suivre la migration dans l'eau aux conditions réelles de conservation et d'utilisation (température ambiante et temps de contact long) ;
- ✚ Mettre au point des méthodes telles HPLC, CPG pour le suivi de la migration car le DEHP est souvent associé à d'autres adjuvants et les méthodes chromatographiques seraient plus appropriées pour son analyse.

---

*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

---

### Références bibliographiques

- **Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA).** (2006). Evaluation sanitaire des matériaux en poly (éthylène téréphtalate) recyclés utilisés en tant que matériaux au contact des denrées alimentaires et de l'eau de boisson.
- **Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES).** (2012). Avis relatif à l'élaboration d'une valeur toxicologique de référence chronique par ingestion pour le phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP)
- **Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES).** (2011). Valeurs limites d'exposition en milieu Professionnel, Évaluation des effets sur la santé et des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail pour le di(2-éthylhexyl) phtalate (DEHP). Rapport d'expertise collective.
- **Agence nationale de sécurité sanitaire, alimentation environnement travail (ANSES).** (2013). Perturbateurs Endocriniens Synthèse et étude des auditions Rapport d'appui scientifique et technique.
- **Agency for Toxic substances and Disease Registry (ATSDR).** (2002). Toxicological Profile for Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.pdf>)
- **Akingbemi B; Youker R; Sottas C; KATZ E.** (2001). Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Biol Reprod* 2001, 65 : 1252-1259
- **Alam M; Ohsako S; Matsuwaki T; Zhu X; Tsunekawa N; Kanai Y; Sone H; Tohyama C; Kurohmaru M.** (2010). Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: a possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reproduction* 2010;139, 427-437
- **Almeras C; Cancan Y; Gereec V; Millet M.** (2010). Les phtalates. Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP) Paris.
- **Amar Yahia H; Dahache ; Sassi Y.** (2007). Industrie du caoutchouc et de plastique en algerie.
- **Auharek S; Franca L; McKinnell C; Jobling M; Scott S; Sharpe R.** (2010). Prenatal plus postnatal exposure to Di(n-Butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final sertoli cell number in the rat. *Endocrinology* 2010; 151, 2868-2875.

## Références bibliographiques

---

- **Bach Campa C.** (2011). Evaluation de la migration des constituants de l'emballage en poly (éthylène téréphtalate) (PET) vers l'eau, des facteurs d'influence et du potentiel toxique des migrants. Thèse de doctorat institut national polytechnique de Lorraine. Paris.
- **Bergé A .** (2012). Identification des sources d'alkylphénols et de phtalates en milieu urbain. Comparaison des rejets à dominante urbaine (domestique) par rapport à des rejets purement industriels. thèse de doctorat. Paris-Est. pg 45.
- **Biscardi D; Monarca S; De Fusco R; Senatore F; Poli P; Buschini A.** (2003). Evaluation of the migration of mutagens/carcinogens from PET bottles into mineral water by Tradescantia/micronuclei test, Comet assay on leukocytes and GC/MS. *Sci Total Environ* 2003;302:101–8.
- **Casajuana N; Lacorte S.** (2003). Presence and release of phthalic esters and other endocrine disrupting compounds in drinking water. *Chromatographia* 2003; 57:649–55.
- **Christiansen S; Boberg J; Axelstad M; Dalgaard M; Vinggaard A; Metzdorff S; Hass U.** (2010). Low-dose perinatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate induces antiandrogenic effects in male rats. *Reprod Toxicol* 2010; 30, 313-321
- **Conseil Européen des Plastifiants et Intermédiaires (ecpi.org).** 2012. Informations sur les phtalates. <http://www.ecpi.org/>
- **Consumer Product Safety Commission (CPSC)** (2010). Overview of dialkyl orthophthalates toxicity. 2010 (<http://www.cpsc.gov/about/cpsia/phthalover.pdf>)
- **Creasy D; Foster PMD.** (2002). Male *Reproductive System*. In: Handbook of Toxicologic Pathology. San Diego: Haschek W. 829-887.
- **Culty M.** (2009). Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009; 87, 1-26
- **David RM; Moore MR; FINNEYD C; GUEST D.** (2000). Chronic toxicity of di(2 ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicol Sci* 2000, 55: 433-443
- **Delbes G; Levacher C; Habert R.** (2006). Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* 2006;132:527–38.
- **Europa.eu.** (2011). L'actualite de l'UE. [http://europa.eu/news/index\\_fr.htm](http://europa.eu/news/index_fr.htm)
- **European Chemicals Bureau (ECB).** <http://ecb.jrc.it>. (2008). European Union Risk Assessment Report, bis(2-ethylhexyl)phtalate (DEHP).

## Références bibliographiques

---

- **European Commission (EC).** (2005). 'Integrated pollution prevention and control. Draft Reference Document on Best Available Techniques in the Production of Polymers. [www. ec.europa.eu/index\\_fr.htm](http://www.ec.europa.eu/index_fr.htm)
- **European Commission (EC).** (2008). The safety of medical devices containing DEHP-plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk. SCENIHR. [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/risk\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/risk_en.htm)
- **European food safety authority (EFSA).** (2005). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. The EFSA Journal (2005) 243, 1-20 (<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/243.pdf>)
- **European food safety authority (EFSA).** (2013) .avis scientifique sur perturbateurs endocriniens ; notes aux rédacteurs. <http://www.efsa.europa.eu/fr/>
- **Feigenbaum A ; Riquet A ; Scholler D.** (1993). Safety and quality of foodstuffs in contact with plastic materials: A structural approach. *Journal of Chemical Education* 70(11), 883-null.
- **Ferrara D; Hallmark N; Scott H; Brown R; McKinnell C; Mahood I; Sharpe R.** (2006). Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology* 2006; 147,
- **Fisher J; Macpherson S; Marchetti S; Sharpe R.** (2003). Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 2003; 18, 1383-1394.
- **Fisher JS; Macpherson S; Sharpe R M .** (2003). Human testicular dysgenesis syndrome : a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 2003, 18: 1383-1394.
- **Gillet G.** (2008). Préviation de la conformité des matériaux d'emballage par intégration des méthodes de déformation et de modélisation du coefficient de partage. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. 9.
- **Gray J ; Ostby J ; VEERAMACHANENI D.** (2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci* 2000, 58 : 350-365

## Références bibliographiques

---

- **Gray J; Barlow N; Ostby J; Furr J.** (2009). Transgenerational effects of di (2-ethylhexyl) phthalate in the male crl : cd(sd) rat : added value of assessing multiple offspring per litter. *Toxicol Sci* 2009, 110 : 411-425
- **Gray L; Laskey J; Ostby J.** (2006). Chronic di-n-butyl phthalate exposure in rats reduces fertility and alters ovarian function during pregnancy in female Long Evans hooded rats. *Toxicol Sci* 2006;**93**, 189-195
- **Haschek W; Rousseaux CG.** (1998). Male *Reproductive System*. In: Fundamentals of Toxicologic Pathology. San Diego: Haschek WM, Rousseaux CG. 443-483.1
- **Heinemeyera G; Sommerfelda C; Springera A; Heilanda A; Lindtnera A.** (2013). Estimation of dietary intake of bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) by consumption of food in the German population International Journal of Hygiene and Environmental Health.
- **Heudorf U; Mersch-Sundermann V; Angerer J.** (2007). Phthalates: Toxicology and exposure. International Journal of Hygiene and Environmental Health (210).
- **Higuchi T; Palmer J; Gray j; VEERAMACHANENI D.** (2003). Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent, or postpubertal exposure. *Toxicol Sci* 2003, 72 : 301-313.
- **Hruska Z; Guesnet P; Couchoud J .** (2007). Poly (chlorure de vinyle) in « Matières thermoplastiques : Monographies. 42147. [www.techniques-ingenieur.fr](http://www.techniques-ingenieur.fr).
- **INERIS.** (2005). Di-(2-éthylhexyl) phtalate (DEHP). Données technico-économiques sur les substances chimiques en France. 15-16.
- **INERIS.** (2006). Chlorure de vinyle. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France.14.
- **Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS).** (2010). Di(2-Ethylhexyl)Phtalate (DEHP) : Stratégie de réduction de la concentration dans les cours d'eau. Rapport d'étude N° DRC-10-102861-02415A.
- **Institut National de la santé et de la recherche médicale (INSERM)** 2011: Reproduction et environnement, [www.inserm.fr/content/.../Synthese Reproduction environnement.pd](http://www.inserm.fr/content/.../Synthese_Reproduction_environnement.pd).
- **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).** (2004). Fiche toxicologique n°FT161. Phtalate de bis(2-ethylhexyle). <http://www.inrs.fr>
- **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).** (2006). Fiche INRS ED5010. Le point des connaissances sur les phtalates. <http://www.inrs.fr>.

## Références bibliographiques

---

- **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).** (2010). Fiche demeter n° DEM 015. Phtalate de bis (2-ethylhexyle) DEHP. Synthèse des niveaux de preuve de danger par période d'exposition.
- **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).** (2012). Produits chimiques cancérogènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction, classification réglementaire.
- **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).** (2013). Phtalate de bis(2-ethylhexyle). <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/biotox.html>.
- **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).** (2013). Surveillance biologique de l'exposition au phtalate de di (2-ethylhexyle) (DEHP) dans six entreprises françaises.
- **Jegou B.** (1996) Les hommes deviennent-ils moins fertiles ? Moins de spermatozoïdes et de qualité moindre ? L'environnement en question. *La Recherche*, 288 : 60-65.
- **Johnson K; Hensley J; Kelso M; Wallace D; Gaido K.** (2007). Mapping gene expression changes in the fetal rat testis following acute dibutyl phthalate exposure defines a complex temporal cascade of responding cell types. *Biol Reprod* 2007;77, 978-989.
- **Jost A ; Vigier B ; Prepin J ; Perchellet JP.** (1973). Studies on sex differentiation in mammals. *Rec Progr Horm Res* 1973;29:1-41.
- **Latini G.** (2005). Monitoring phthalate exposure in humans. *Clinica Chimica Acta*. nov; 361(1-2):20-29.
- **Latini G; Del Vecchio A; Massaro M; Verrotti A; De Felice C.** (2006). Phthalate exposure and male infertility. *Toxicology* 2006;226:90-8.
- **Lau O; Wong K** (2000). Contamination in food from packaging material. *Journal of*
- **Lee B; Koo H.** (2007). Hershberger assay for antiandrogenic effects of phthalates. *J Toxicol Environ Health A* 2007, 70 : 1365-1370
- **Lezervant.** (2007). Activation des phénomènes de migration dans les emballages. Application à la sécurité alimentaire des aliments. Thèse de doctorat. INRA.15.
- **Lin H; Ge R; Chen G; Hu G; Dong L; Lian Q; Hardy D.** (2008). Involvement of testicular growth factors in fetal Leydig cell aggregation after exposure to phthalate in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105, 7218- 7222.
- **Liu K; Lehmann K; Sar M; Young S; Gaido K.** (2005). Gene expression profiling following in utero exposure to phthalate esters reveals new gene targets in the etiology of testicular dysgenesis. *Biol Reprod* 2005;73, 180-192.

## Références bibliographiques

---

- **Lu B; Bishop CE.** (2003). Late onset of spermatogenesis and gain of fertility in POG-deficient mice indicate that POG is not necessary for the proliferation of spermatogonia. *Biol Reprod* 2003;69:161–8.
- **Marcel H.** (2002). "Fonction emballage", *Techniques de l'ingénieur*, AG 6000, 3 – 14.
- **Marie-Hélène D ; Karyn L ; Liza Vi; Lodovico D; Patrick L; Hélène B.** (2013). Ultra-trace analysis of hormones, pharmaceutical substances, alkylphenols and phthalates in two French natural mineral waters. *Science of the Total Environment* 443 (2013) 621–632.
- **Mkacher.** (2012). Vieillesse thermique des gaines PE et PVC. Thèse de doctorat. ParisTech. 17- 146.
- **Montuori P; Jover E; Morgantini M; Bayona JM; Triassi M.** (2008). Assessing human exposure to phthalic acid and phthalate esters from mineral water stored in polyethylene.
- **Muczynski V.** (2011). Polluants environnementaux et développement du testicule fœtal humain : Effets et mécanismes d'action des phtalates. Thèse de doctorat en Biologie de la reproduction et du développement, université Paris-Sud 11. 55-105.
- **Office fédéral de l'environnement (OFEV).** (2011). **Compte rendu sur l'environnement**. <http://www.bafu.admin.ch/umweltbeobachtung/02272/02276/index.html?lang=fr>
- **Office fédéral de l'environnement (OFEV).** (2013). fiche d'information. Perturbateurs endocriniens
- **Office fédéral de la santé publique (OFSP).** (2012). Fiche d'information : les phtalates. [www.bag.admin.ch/themen/chemikalien/00228/01378/index.html?lang=fr&download=NHZLpZeg7t,lnp6I0NTU04212Z6ln1ae2IZn4Z2qZpnO2Yuq2Z6gpJCLdIB6e2ym162epYbg2c JjKbNoKSn6A--](http://www.bag.admin.ch/themen/chemikalien/00228/01378/index.html?lang=fr&download=NHZLpZeg7t,lnp6I0NTU04212Z6ln1ae2IZn4Z2qZpnO2Yuq2Z6gpJCLdIB6e2ym162epYbg2c JjKbNoKSn6A--)
- **Office fédéral de la santé publique (OFSP).** (2013). **Phtalates - les plastifiants peuvent-ils rendre les hommes stériles ?** <http://www.bag.admin.ch/themen/chemikalien/00228/01378/index.html?lang=fr>
- **Organisation Mondiale de la Santé (OMS).** (2012). Endocrine disrupters and child health. Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health.

## Références bibliographiques

---

- **Orth JM; Gunsalus GL; Lamperti AA.** (1988). Evidence from sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 1988;122:787–94.
- **Peijnenburg WJ et Struijs J.** (2006). Occurrence of phthalate esters in the environment of The Netherlands. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006, **63** : 204-215
- **Pennarun P.** (2001). Migration from recycled PET bottles. Elaboration and validation of a Chromatography A 882, 255-270
- **Plastalger.com .** (2012). L'industrie algérienne des plastiques
- **Plasticisers.org.** (2010). Plasticisers. <http://www.plasticisers.org/plasticisers>
- **PlasticsEurop.org.** (2012). Plastiques 2012 – Faits et chiffres ; Analyse de la production et de la demande en plastiques & de la gestion des déchets en Europe en 2011.
- **Pouchert J.** (2006). The Aldrich library of FTIR spectra. 2A. Aldrich chemical.
- **REACH.** (2011). REACH for Polymers. Meilleures méthodes d'essai et techniques disponibles
- **Réseau environnement santé (RES).** 2012. Les phtalates : Sources d'exposition et imprégnation humaine. [www.reseau-environnement-sante.fr](http://www.reseau-environnement-sante.fr)
- **Ricard I.** (2011). Les perturbateurs endocriniens dans l'environnement de l'enfant et de l'adolescent et les risques pour la santé. L'exemple des phtalates et du bisphénol A. thèse pour obtenir le grade de docteur en médecine ; Paris. 60-80.
- **Riquet A ; Wolff N; Feigenbaum A.** (1998). Food and packaging interactions: determination of the kinetic parameters of olive oil diffusion in polypropylene using concentration profiles. *Food Additives and Contaminants*, 1998, Vol. 15, N°. 6, 690-700.
- **Rouiller-Fabre V; Lambrot V; Muczynski V; Coffigny H; Habert R.** (2008). Ontogenèse et régulations des fonctions testiculaires chez le fœtus humain. Development and regulations of testicular functions in the human foetus. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 36 (2008) 898 907.
- **Rylee Phuong D; Richard W; Stahlhutb; Davide P; Frederick S; Saala V; Julia A.** (2012). Non-monotonic dose effects of in utero exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on testicular and serum testosterone and anogenital distance in male mouse fetuses. *Reproductive Toxicology* 34 (2012) 614– 6212012

## Références bibliographiques

---

- **Safa L; Abbes B.** (2002). Experimental and Numerical Study of Sorption/diffusion of Esters into Polypropylene Packaging Film. *Packaging Technology and Sciences*, 2002, Vol. 15, 55-64
- **Saillenfait** (2010). Etude du mode d'action reprotoxique de phtalates: Cas du phtalate de di n-hexyle, B.4/2.164.
- **Saillenfait A ; Roudot A ; Gallissot F; Sabate J; Chagnon M.** (2011). Developmental toxic potential of di-n-propyl phthalate administered orally to rats. *J Appl Toxicol* 2011;31, 36-44
- **Saillenfait A ; Laudet-Hesbert.** (2005). Phthalates. EMC-Toxicologie Pathologie 2 1–13
- **Saillenfait A ; Sabaté J ; Gallissot F.** (2008). Diisobutyl phthalate impairs the androgen-dependent reproductive development of the male rat. *Reproductive Toxicology* 26 (2008) 107–115.
- **Saillenfait A ; Sabaté J, Gallissot F.** (2009). Effects of *in utero* exposure to di-n-hexyl phthalate on the reproductive development of the male rat. *Reproductive Toxicology* 28 (2009) 468–476
- **Saillenfait A; Sabate J; Gallissot F.** (2009). Effects of in utero exposure to di-n-hexyl
- **Sathyanarayana S; Alcedo G; Saelens B; Zhou C; L Dills R; Yu J; Lanphear B.**(2013). Unexpected results in a randomized dietary trial to reduce phthalate and bisphenol A exposures. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* ,doi:10.1038/jes.2013.9
- **Scott H; Hutchison G; Jobling M; Mckinnell C; Drake A.** (2008). Relationship between androgen action in the "male programming window," fetal Sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinology* 2008, 149: 5280-5287.
- **Senthil N; Ligy P.** (2009). Leaching of DEHA and DEHP from PET bottles to water. Environmental and Water Resources Division Department of Civil Engineering. Indian Institute of Technology Madras.
- **Severin I ; Riquet A ; Chagnon M.** (2011). Évaluation et gestion des risques- Matériaux d'emballage à contact alimentaire. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 46(2), 59-66.

## Références bibliographiques

---

- **Sharpe RM.** (2006). Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20:91–110
- **Sharpe RM; Skakkebaek NE.** (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 1993;341: 1392–5.
- **Shultz V; Phillips S; Sar M; Foster P; Gaido K.** (2001). Altered gene profiles in fetal rat testes after in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 2001;64, 233-242.
- **Simoneau C.** (2008). Food Contact Materials. 733-773.
- **Slama R; Jegou B; Cordier S.** (2006). Breakthroughs in the study of the influence of environmental factors on male reproductive health. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2006;54:167–74.
- **Srivastavas S; Awasthi VK; Srivastava SP; Seth PK.** (1989). Biochemical alterations in rat fetal liver following in utero exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Indian J Exp Biol* 1989, 27 : 885-888
- **Stroheker T; Regnier J; Lassurguere J; Chagnon M.** (2006). Effect of in utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate: distribution in the rat fetus and testosterone production by rat fetal testis in culture. *Food Chem Toxicol* 2006;44, 2064-2069
- **Stroheker T; Regnier JF; Lassurguere J; Chagnon MC.** (2006). Effect of in utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate: distribution in the rat fetus and testosterone production by rat fetal testis in culture. *Food Chem Toxicol* 2006, 44 : 2064-2069
- **Swan SH.** Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ. Res.* 2008 oct;108(2):177-184.
- **Swan SH; Main KM; Liu F; Stewart SL; Kruse RL; Calafat AM.** (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 2005;113:1056–61.
- **Tabb D; Koenig J.** (1975). Fourier Transform Infrared Study of Plasticized and Unplasticized Poly(vinyl chloride). *Macromolecules*, 8(6): p. 929-934.
- **terephthalate and glass bottles.** *Food Addit Contam* 2008; 25:511–8.
- **Toppari J; Kaleva M; Virtanen HE.** (2001). Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum Reprod Update* 2001;7: 282–6.

## Références bibliographiques

---

- **Tyl R; Myers C; Marr M; Fail P; Seely J; Brine D; Barter R; Butala J H.** (2004). Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod Toxicol* 2004;**18**, 241-264
- **Virgilio A ; Eusepi A ; Romeo A ; Magrelli A.** (2010). In utero exposure to di-(2 ethylhexyl) phthalate affects liver morphology and metabolism in post-natal CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 2010;29, 427-432
- **Wittassek M; Angerer J; Kolossa-Gehring M; Schafer SD.** (2009). Fetal exposure to phthalates-a pilot study. *Int J Hyg Environ Health* 2009, 212 : 492-498
- **Wittassek M; Hegerw; Koch H; Kolossa-Gehring M.** (2007). Daily intake of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) by German children A comparison of two estimation models based on urinary DEHP metabolite levels. *Int J Hyg Environ Health* 2007, 210 : 35-42
- **Wolfe GW; Layton KA.** (2003). Multigeneration reproduction toxicity study in rats: multigenerational reproductive assessment by continuous breeding when administered to Sprague-Dawley rats in the diet. TRC Study No. 7244-200.
- **Zaki O.** (2008). Contribution à l'étude et à la modélisation de l'influence des phénomènes de transferts de masse sur le comportement mécanique de flacons en polypropylène. Thèse de doctorat. Paris-Est. 15- 38.

## Webographie

- <http://www.industrie.com/emballage/alimentaire/le-reglement-europeen-n10-2011-publie.18197>. Le règlement européen n°10/2011 publié
- <http://www.contactalimentaire.com/index.php?id=520&task=show&uid=2569&cHash=5317a49659>. Règlement CE n°10/2011 de la Commission du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires
- <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31967L0548:fr:NOT>. Directive n° 67/548/CEE du 27/06/67 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses.

## *Références bibliographiques*

---

- [http://www.contactalimentaire.com/fileadmin/ImageFichier\\_Archive/contact\\_alimentaire/Fichiers\\_Documents/Directives/Rg\\_10-2011.pdf](http://www.contactalimentaire.com/fileadmin/ImageFichier_Archive/contact_alimentaire/Fichiers_Documents/Directives/Rg_10-2011.pdf). Le règlement CE n°10/2011, du 14 janvier 2011, concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.
- <http://www.mincommerce.gov.dz/fichiers09/loi0903fr.pdf>. Le décret exécutif n° 91-04 relatif aux matériaux destinés à être mis en contact avec les denrées alimentaires et les produits de nettoyage de ces matériaux.
- <http://www.mincommerce.gov.dz/fichiers09/loi0903fr.pdf>. Loi n09-03 du 29 Safar 1430 correspondant au 25 février 2009 relative à la protection du consommateur et à la répression des fraudes, article 07.

---

# *ANNEXES*

---

## **ANNEXE**

---

### **ANNEXE A : Etude de la linéarité de la méthode UV- visible**

**Tableau A1 : Linéarité du DEHP dans l’Ethanol**

C (mg/ml) 10 <sup>3</sup>	4.251	8.604	17.208	25.812	34.416	43.020
A (276nm)	0.019	0.036	0.063	0.084	0.117	0.139
A (225nm)	0.151	0.287	0.478	0.608	0.845	0.999

**Tableau A2 : Linéarité du DEHP dans l’Ethanol/eau (50/50)**

C (mg/ml) 10 <sup>3</sup>	8.604	17.208	25.812	34.416	43.020	85.00
A (276nm)	0.046	0.058	0.086	0.127	0.143	0.276
A (225nm)	0.290	0.413	0.572	0.811	0.945	1.670

**Annexe B : Essais de migration de 2h à 70°C par UV-visible****Tableau B1 : Etude de la migration du DEHP dans l’Ethanol 100% par UV-visible**

T <sub>emps</sub> mn	10	20	30	40	50	60	80
A (276)	0.001	0.006	0.015	0.028	0.034	0.033	0.039
A (225)	/	0.063	0.134	0.183	0.238	0.240	0.284
T <sub>emps</sub> mn	100	120	150	180	240	2h <sub> reflux</sub>	Blanc
A (276)	0.048	0.051	0.054	0.054	0.053	0.049	0.003
A (225)	0.320	0.351	0.352	0.361	0.367	0.419	0.048

**Tableau B2: Etude de la migration du DEHP dans l’Ethanol/eau 50% par UV-visible**

T <sub>emps</sub> mn	10	20	30	40	50	60	80
A (276)	0.025	0.027	0.033	0.052	0.075	0.090	0.106
A (225)	0.145	0.157	0.228	0.320	0.374	0.498	0.555
T <sub>emps</sub> mn	100	120	150	180	240	2h <sub> reflux</sub>	Blanc
A (276)	0.118	0.141	0.146	0.146	0.151	0.149	0.005
A (225)	0.690	0.811	0.842	0.851	0.845	0.869	0.051

**ANNEXE C : Essais de migration de 2h à 70°C par FTIR****Tableau C1 : Cinétique de migration du DEHP dans l’Ethanol 100 % par FTIR**

Temps mn	M <sub>0</sub> mg	S <sub>0</sub> (1720cm <sup>-1</sup> )	S <sub>t</sub> (1720cm <sup>-1</sup> )	m <sub>t</sub>	% migration
10	16.41	1008.75	352.53	10.67	65.02
20	15.96	987.74	379.72	9.82	61.53
30	16.68	936.81	298.82	11.36	68.10
40	15.96	11088.89	314.73	11.34	71.05
50	16.44	1005.57	236.61	12.57	76.46
60	16.17	944.49	192.44	12.87	79.59
80	16.38	998.87	163.06	13.70	83.64
100	16.02	746.25	117.94	13.49	84.08
120	16.65	1000.76	100.37	14.98	89.97
150	16.74	907.62	93.82	14.68	87.69
180	16.35	962.46	108.36	14.51	88.74
240	16.50	1003.14	81.61	14.74	91.84
2h reflux	16.74	965.36	52.07	15.83	94.56

**Tableau C2 : cinétique de migration du DEHP dans l'Ethanol/eau 50% par FTIR**

Temps mn	M <sub>0</sub> mg	S <sub>0</sub> (1720cm <sup>-1</sup> )	S <sub>t</sub> (1720cm <sup>-1</sup> )	m <sub>t</sub>	% migration
10	18.21	828.76	872.25	/	/
20	18.36	1065.01	671.34	6.78	36.92
30	18.48	1065.21	680.85	6.67	36.09
40	19.32	871.70	524.39	7.69	39.80
50	19.14	885.74	440.90	9.61	50.20
60	19.20	949.94	461.06	9.88	51.22
80	19.26	1018.13	448.18	10.78	55.97
100	19.32	1166.59	493.43	11.15	57.71
120	18.60	1101.67	455.23	10.91	58.65
150	18.90	996.99	405.59	11.21	59.31
180	19.29	962.39	286.43	13.55	70.24
240	18.93	882.75	186.98	14.92	78.81
2h refulx	19.85	976.52	220.52	15.36	77.38

**ANNEXE D** : Essais de migration de 10 jours à 50°C par FTIR

**Tableau D: Cinétique de migration du DEHP (10J/50°C/Ethanol 100%) par FTIR**

Temps (jour)	M <sub>0</sub> mg	S <sub>0</sub> (1720cm <sup>-1</sup> )	S <sub>t</sub> (1720cm <sup>-1</sup> )	M <sub>t</sub> mg
0.083	17.34	807.17	716.18	1.95
0.166	17.31	500.72	392.43	3.74
1.0	17.28	1113.29	703.13	6.36
2.0	17.37	1109.45	231.24	13.74
4.0	15.99	1147.07	106.33	14.5
5.0	17.01	801.04	80.82	15.29
8.0	18.0	1055.91	104.75	16.21
11.0	18.09	1117.71	86.77	16.68
12.0	18.06	1176.01	119.43	16.22