

UNIVERSITE SAAD DAHLAB-BLIDA 1

Faculté de Technologie

THESE DE DOCTORAT LMD

en Génie des Procèdes

Spécialité: Génie de l'Environnement

ETUDE DE LA TOXICITE A FAIBLES DOSES DES PHTALATES ET
DEVELOPPEMENT D'UNE METHODOLOGIE ANALYTIQUE DE LEUR DOSAGE
DANS L'ENVIRONNEMENT

Par

Malha OUDIR

Devant le jury composé de:

W. NACEUR	Professeur, U de Blida1	Président
O. BOURAS	Professeur, U de Blida1	Examineur
H. LARIBI-HABCHI	MCA, U de Blida1	Examineur
A. LAMARA	MCA, ENSV; Alger	Examineur
B. BOUZID	Professeur, U de Blida1	Directeur de thèse

Blida, Juillet 2018

RESUME

Le Di (2-ethylhexyl) phtalate (DEHP) est un perturbateur endocrinien omniprésent dans l'environnement, l'évaluation de ses effets trans-générationnels à faibles doses, sur le système de reproduction chez le rat et le développement d'une méthodologie analytique alternative de son dosage dans l'eau, en se focalisant sur la maîtrise des contaminations environnementales, étaient les deux principaux objectifs de travail de cette thèse. Une étude trans-générationnelle de toxicité pour la reproduction chez le rat avec les doses de 0.5, 50 et 5000 $\mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{j}$ a été réalisée dans la première partie de ce travail. Les principaux paramètres reproductifs évalués sont: Concentration spermatique, Testostérone, Puberté, Fertilité et AGD. Une mise au point et la validation d'une méthode analytique par HPLC-UV a été réalisée dans la deuxième partie de ce travail. Conditions opératoires de la méthode HPLC-UV: phase mobile constituée de 100% Acétonitrile sur une colonne C18, mode isocratique, débit 0.6ml/mn, volume d'injection 50 μl , détection à 225 et 275nm et temps d'analyse de 20mn. Optimisation des procédés de préconcentration par lyophilisation et extraction SPE, application de la méthode validée sur les eaux minérales. Les principaux résultats obtenus sont les suivant : Infertilité totale chez les rats F0 exposés pendant la période post-natale à 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$. Réduction de la concentration spermatique de 46%, 24% et 41% chez F0 paternelle aux doses 5000, 50 et 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg PC}/\text{j}$, respectivement. 47% avec un cas d'azoospermie et 38% chez la descendance F1 paternelle aux doses 50 et 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg PC}/\text{j}$, respectivement. Une courbe dose-réponse non monotonique, sous forme "U" inversé a été observé pour la testostérone de génération F0 exposées pendant la période post-natale avec une augmentation significative à 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$. La méthode HPLC-UV a été validée dans le domaine de concentration entre 900-2000 $\mu\text{g}/\text{l}$ avec un R^2 de 0.999. Le taux de recouvrement était de 99.99% avec un RSD de 0.82%. Les LOD et LOQ étaient de 23 et 71 $\mu\text{g}/\text{l}$, respectivement. Les rendements de pré-concentration ont été de 145 et 70% pour la lyophilisation et extraction SPE, respectivement. En conclusion, l'étude trans-générationnelle a démontré que les doses réglementaires ne sont pas valables pour le DEHP, et la validation analytique a montré que la méthode HPLC-UV ne peut pas s'appliquer au dosage du DEHP en traces.

Mots clés: Phtalates, Faibles doses, Toxicité, méthodologie analytique, HPLC.

ملخص

أل دي (2-إيثيل هكسيل) فثالات (DEHP) يعتبر من أكثر المسببات للاختلال الهرموني، الموجودة في البيئة، تقييم آثاره على الجهاز التناسلي للفئران في الجرعات البيئية عبر الأجيال، ووضع منهجية تحليلية بديلة لقياسه في الماء، مع التركيز على التحكم في التلوث البيئي، كانا الهدفان الرئيسيان لهذه الأطروحة.

لقد قمنا بدراسة التأثيرات السامة للفتلات (DEHP) على الجهاز التكاثري عبر الأجيال بجرعات تتراوح بين 0.5 و 50 و 5000 ميكروغرام / كغ / يوم. من المعايير التكاثرية الرئيسية التي تم تقييمها هي: تركيز الحيوانات المنوية التشريح المرضي للأعضاء التناسلية الخصوبة، البلوغ، هرمون التستسترون و المسافة الشرجية. كما قمنا بوضع منهجية تحليلية لقياس الفتلات (DEHP) في الماء بتقنية VU- CLPH التي شروطها المخبرية هي: المرحلة المتحركة تتكون من 100% أسيتونتريل على عمود 18C، طريقة إزوكراتيك، معدل التدفق 0,6 ملل/ دقيقة، حجم الحقن 50 ميكرومتر، الكشف في 225 و 275 نانومتر ووقت التحليل 20 دقيقة. تعزيز عمليات التركيز المسبق بتقنية التجفيف بالتجميد و الاستخلاص عبر طبقة صلبة SPE، تطبيق الطريقة المبتكرة على المياه المعدنية.

النتائج المتحصل عليها هي: العقم الكلي عند الفئران OF المتعرضة خلال فترة ما بعد الولادة إلى 5000 ميكروغرام / كغ / يوم. انخفاض تركيز الحيوانات المنوية من 46%، 24% إلى 41% عند الأب FO في الجرعات 50 و 500 و 0,5 ميكروغرام / كغ / يوم، على التوالي. 47% مع حالة انعدام النطاف و 38% في سلالة الأب 1F في الجرعات 50 و 0,5 ميكروغرام / كغ / يوم، على التوالي. منحنى الاستجابة للجرعة علي شكل حرف U مقلوب كان قد لوحظ للتستسترون لجيل FO المتعرض خلال فترة ما بعد الولادة مع زيادة كبيرة إلى 50 ميكروغرام / كغ / يوم.

الطريقة VU- CLPH تم التحقق من صحتها في مجال التركيز بين 900-2000 ميكروغرام / ل مع $R^2 = 0,999$. كان معدل الاسترداد 99,99% مع RSD تساوي 0,82%. وكانت كل من LOQ و LOD على التوالي 71 و 23 ميكروغرام / ل. كانت عائدات ما قبل التركيز 145 و 70% لتجفيف و الاستخلاص SPE علي التوالي.

وبالتالي أوضحت هذه الدراسة أن الجرعات التنظيمية غير صالحة ل DEHP، كما أظهر التحقق التحليلي أن طريقة VU- CLPH لا يمكن تطبيقها على معايرة DEHP المتواجد بكميات جد خفيفة.

الكلمات المفتاحية: الفثالات، الجرعات المنخفضة، السمية، المنهج التحليلي، VU- CLPH

ABSTRACT

Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is an endocrine disruptor ubiquitous in the environment, the evaluation of its trans-generational effects at environmental doses, on the rat reproductive system and the development of an alternative analytical methodology of its dosage in water, focusing on the control of environmental contaminations, were the two main work objectives of this thesis. Methodology: 1) Trans-generational study of reproductive toxicity in rats with doses of 0.5, 50 and 5000 $\mu\text{g} / \text{kg BW} / \text{day}$. The main reproductive parameters evaluated are: Sperm count, Testosterone, Puberty, Fertility, AGD and histopathology of the reproductive organs. 2) Development and validation of an analytical method by HPLC-UV. Operating conditions of the HPLC-UV method: mobile phase consisting of 100% acetonitrile on a C18 column, isocratic mode, flow rate 0.6 ml / min, injection volume 50 μl , detection at 225 and 275 nm and analysis time of 20 minutes. Optimization of pre-concentration processes by freeze drying and SPE extraction, application of the validated method on mineral water. Results: Total infertility in F0 rats exposed during the postnatal period to 5000 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{day}$. Reduced sperm count by 46%, 24% and 41% in paternal F0 at doses of 5000, 50 and 0.5 $\mu\text{g} / \text{kg bw} / \text{day}$, respectively. 47% with a case of azoospermia and 38% with F1 paternal progeny at doses of 50 and 0.5 $\mu\text{g} / \text{kg bw} / \text{day}$, respectively. A non-monotonic, inverted U-shaped dose-response curve was observed for F0 generation testosterone exposed during the postnatal period with a significant increase at 50 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{d}$. The HPLC-UV method has been validated in the concentration range between 900-2000 $\mu\text{g} / \text{l}$ and an R2 of 0.999. The recovery rate was 99.99% with a RSD of 0.82%. LOD and LOQ were 23 and 71 $\mu\text{g} / \text{l}$, respectively. The pre-concentration yields were 145 and 70% for freeze-drying and SPE extraction, respectively. Conclusion: The trans-generational study demonstrated that the regulatory doses are not valid for DEHP, and the analytical validation has shown that the HPLC-UV method can't be applied to the determination of DEHP in traces.

Key words: Phthalates, Low doses, Toxicity, analytical methodology, HPLC

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette présente thèse ont été réalisés en collaboration avec le Service Pharmacotoxicologie de Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP), le Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique de l'Hôpital Hospitalo-Universitaire Beni Messous, Laboratoire d'Analyses Médicales A. Boukhtouche, le Laboratoire de Contrôle Qualité "WanyLab", le Centre de Bioéquivalence de Saidal et le Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA).

Tout d'abord, je tiens à remercier mon Directeur de thèse, Professeur Bachir Bouzid, et tous les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail de thèse:

Mr Wahib Naceur, merci pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de présider le jury de ce travail de thèse, Mr Omar Bouras, Madame Hassiba Laribi,, Monsieur Ali Lamara, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail de thèse veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect;

Je tiens à manifester toute ma gratitude et mes vifs remerciements à Monsieur Henni Chader le chef de Service Pharmacotoxicologie de LNCPP de m'avoir donné libre accès à son service et de mettre à ma disposition l'animalerie pendant toute la période de mon expérimentation in vivo. Professeur Bouzid Bendisari Kheira et Professeur Latreche Batoul de laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique de l'Hôpital Hospitalo-Universitaire Beni Messous, , Je tiens également à adresser ma gratitude et mes vifs remerciements à Madame Nassima Hamdi directrice et propriétaire de laboratoire de contrôle qualité "WanyLab", de m'avoir donné libre accès à son laboratoire et de mettre à ma disposition l'HPLC avec tous les solvants et réactifs nécessaires à la validation analytique, particulièrement les étalons des différents phtalates . Je tiens à adresser ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à ma très chère amie et sœur Zahra AitMesbah, qui m'a accompagné pendant tout mon long parcours. Enfin un grand merci à ma famille particulièrement mes deux parents pour leur confiance et surtout pour leur soutien financier pendant tout mon long parcours des études, sans eux rien n'aurait été possible. Merci à mes chers sœurs et frères. Que cette thèse leur soit dédiée...

TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION	11
1. L'APPAREIL REPRODUCTEUR MALE DE RAT	15
1.1. Généralités	15
1.2. Testicules	15
1.3. Epididymes	19
2. ENVIRONNEMENT ET DETERIORATION DE LA SANTE REPRODUCTIVE	20
2.1. Syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS)	20
2.2. Perturbateurs endocriniens et changement de paradigme	
3. LES PHTALATES	28
3.1. Généralités	28
3.2. Di (2-éthylhexyl) phtalate (DEHP)	
4. DETERMINATION ANALYTIQUE DU DEHP	44
4.1. Difficultés analytiques: problématique du "blanc" analytique	44
4.2. Techniques de préconcentration des phtalates (DEHP)	46
5. MATERIEL ET METHODES	54
5.1. Matériel	54
5.2. Méthodologie expérimentale	56
6. RESULTATS	79
6.1. Résultats de l'étude de reprotoxicité à faibles doses du DEHP	79
6.2. Résultats de la partie analytique	92
7. DISCUSSION	101
CONCLUSION	112
APPENDICE	114
A. Liste des symboles	114
B: Quelques conseils pratiques pour diminuer l'exposition aux phtalates	115
REFERENCES	118

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1. Photographie de l'appareil reproducteur d'un rat mâle	15
Figure 1.2: A: Coupe longitudinale de testicule	18
Figure 1.3: Anatomie et section longitudinale (HE) de l'épididyme de rat	19
Figure 2.1: Déclin de la concentration spermatique entre 1970 et 2010	20
Figure 2.2: Hypothèse d'origine du syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS)	22
Figure 2.3: Exemples de courbes dose-réponse	24
Figure 2.4: Effets Multi et trans-générationnels	26
Figure 3.1: Sources et voies d'exposition humaine au DEHP	32
Figure 4.1: Concentrations du DEHP observées dans les blancs	45
Figure 4.2: Processus d'extraction SPE	48
Figure 5.2: Conception de l'expérimentation animale	60
Figure 5.3: Différentes étapes d'évaluation des paramètres spermatiques	62
Figure 5.4: DAG chez le rat mâle	64
Figure 5.5: Raton mâle au sevrage et son appareil reproducteur	65
Figure 5.6: Progression de la séparation de prépuce	65
Figure 5.7: Verrerie chauffée à 400°C et obturée à l'aluminium	68
Figure 5.8: Préparation de la gamme d'étalonnage	71
Figure 5.9 : Etapes de l'extraction SPE	74
Figure 5.10: Etapes de la préconcentration par lyophilisation	76
Figure 5.11: Organigramme de dosage du DEHP par HPLC-UV	77
Figure 6.1: Effets d'exposition au DEHP sur la concentration spermatique	81
Figure 6.2: Effets d'exposition aux faibles doses du DEHP sur le niveau de la testostérone	82
Figure 6.3: Testicule d'un rat de F1 azoospermique et d'un rat témoin	83
Figure 6.4: Coupes histologiques de testicule et épидидyme de rats F0 au 120 ^{eme} JPN	86
Figure 6.5: A. Amas de cellules de Leydig révélé par IHC	86
Figure 6.6: Lésions histologiques dans le testicule et épидидyme de rats F1	88
Figure 6.7: Effets du DEHP sur la puberté chez la descendance F1	91
Figure 6.8: Spectre UV du DEHP dans le méthanol	92
Figure 6.9: Profils chromatographiques du DEHP	94
Figure 6.10: Droites d'étalonnage du DEHP	96
Figure 6.11: Chromatogrammes du blanc, DEHP, DBP et DIBP à 225nm	97
Figure 6.12: Chromatogrammes des blancs	100

Tableau 3.1 : Identité des principaux phtalates	29
Tableau 3.2: Propriétés physico-chimiques du DEHP	30
Tableau 3.3: Classifications réglementaires du DEHP	38
Tableau 4.1: Sources et valeurs de contamination en DEHP	45
Tableau 4.2: Récapitulatif des conditions opératoires et résultats de dosage du DEHP dans l'eau minérale embouteillée en PET par HPLC-UV et CPG	51
Tableau 5.1: Pureté et la provenance des solvants et réactifs utilisés	54
Tableau 5.2: Appareillage employé	55
Tableau 6.1: Indices de reproduction de F0 et F1 parentales	80
Tableau 6.2: Poids de testicules, épидидymes et corporel de F0 et F1 paternelles	84
Tableau 6.3: Lésions histologiques dans le testicule et épидидyme de rats F0 au 120 ^{ème} JPN	85
Tableau 6.4: lésions histologiques dans le testicule et épидидyme des rats F1 au 120 ^{ème} JPN	87
Tableau 6.5: Evolution pondérale de la DAG durant la lactation des générations F1 et F2	89
Tableau 6.6: Testostérone et poids des organes reproducteurs de F1 et F2 au sevrage	90
Tableau 6.7: Valeurs chromatographiques obtenues	93
Tableau 6.8: Conditions chromatographiques optimisées	93
Tableau 6.9: Résultats des essais de validation dans le domaine de 10 à 100µg/l à 225nm	95
Tableau 6.10: Paramètres de validation dans le domaine 900-2000µg/l	96
Tableau 6.11: Rendements de préconcentration par SPE et lyophilisation	98
Tableau 6.12: Résultats de dosage du DEHP dans l'eau minérale par HPLC-UV	98
Tableau 6.13: Résultats des blancs réalisés au cours de la procédure analytique	99

INTRODUCTION

Nous assistons depuis quelques années à une augmentation spectaculaire des maladies de l'appareil reproducteur mâle, plusieurs études épidémiologiques ont démontré une baisse de la concentration spermatique dans les pays industrialisés. La prise de conscience du grand public et des autorités sanitaires a commencé à partir de la publication de CARLSEN et ses collaborateurs en 1992 qui ont suggéré une baisse de la concentration spermatique humaine de 50 % entre 1930 et 1991. Cette publication a connu une très grande déflagration et a attiré l'attention du grand public, des médias, des autorités sanitaires ainsi que la communauté scientifique. Elle a également suscité beaucoup de controverses et d'inquiétudes en raison de l'importance de la question qui menace l'extinction de la race humaine. Ce fait a été confirmé récemment, en 2017, par LEVINE et ses collaborateurs qui ont examiné 7518 résumés et 2510 articles complets publiés entre 1981 et 2013, rapportant des données sur la concentration spermatique dans différentes régions géographiques du monde, incluant l'Amérique, Europe, Australie, New Zélande, Asie et l'Afrique. Les auteurs ont confirmé la baisse de la concentration spermatique de 50 à 60% entre 1973 et 2011. Cette baisse de concentration spermatique a été associée à l'infertilité masculine qui atteint 25% dans les pays Européens. En 2017, BOWMAN et ses collaborateurs ont indiqué que jusqu'à 40% des jeunes hommes Européens présentent une faible qualité du sperme et ont des difficultés à avoir des enfants. Parallèlement, le cancer testiculaire a connu une explosion dramatique, en 2018, la société américaine de cancer "The American Cancer Society" a enregistré 9,310 nouveau cas au Etats Unis d'Amérique avec une incidence annuelle de 5.5. De même, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a signalé que l'incidence du cancer testiculaire dans le monde a triplé ces dernières années. Dans le même temps, les deux malformations congénitales de l'appareil reproducteur mâle, cryptorchidie et hypospadias n'ont pas cessé d'amplifier, accompagnées par un organe sexuel très court et féminisation des mâles.

Les causes de ces pathologies restent jusqu'à présent inconnues, cependant, un nombre important d'études scientifiques et rapports des instances sanitaires et environnementales ont associé ces différentes anomalies de l'appareil reproducteur à l'exposition à certains facteurs environnementaux capables d'interférer avec le système endocrinien, en mimant ou en bloquant l'action des hormones naturelles pour donner ainsi une perturbation endocrinienne, ces facteurs environnementaux sont désignés sous le nom "Perturbateurs Endocriniens".

Le terme « perturbation endocrinienne » a été inventé 1991, lors de la conférence de Wingspread organisée par THEO COLBORN, qui a étudié l'impact de la pollution chimique sur la faune des grands lacs, les résultats ont été publiés dans un livre qui a effrayé le monde scientifique sous le titre "L'HOMME EN VOIE DE DISPARITION" dont les principales déclarations sont:

- "De nombreux composés libérés dans l'environnement par les activités humaines sont capables de dérégler le système endocrinien des animaux, y compris l'homme. Les conséquences de tels dérèglements peuvent être graves, en raison du rôle de premier plan que les hormones jouent dans le développement de l'organisme".
- " De nombreuses populations des animaux sauvages sont déjà affectées par les polluants chimiques, les effets incluent le mauvais fonctionnement de la thyroïde chez les oiseaux et les poissons ; une baisse de fertilité chez les oiseaux, les poissons, les coquillages et les mammifères ; une diminution des éclosions chez les oiseaux, les poissons et les tortues ; des malformations grossières à la naissance chez les oiseaux, les poissons et les tortues ; des anomalies du métabolisme chez les oiseaux, les poissons et les mammifères; la féminisation des mâles chez les poissons, les oiseaux et les mammifères ; des anomalies de comportement chez les oiseaux : la masculinisation des femelles chez les poissons et les oiseaux ; des déficits immunitaires chez les oiseaux et les mammifères".
- "Les humains sont également affectés par ces composés. Le distilbène, un médicament de synthèse, et beaucoup de composés cités en note ont des effets oestrogéniques. Les femmes dont les mères ont ingéré du distilbène sont particulièrement touchées par le cancer du vagin, par diverses malformations de l'appareil reproducteur, par des grossesses anormales et des modifications de la réponse immunitaire. Les hommes et les femmes exposés pendant leur vie prénatale présentent des anomalies congénitales de l'appareil reproducteur et une baisse de fertilité. Les effets observés chez les victimes du distilbène sont semblables à ce que l'on observe chez les animaux contaminés, dans la nature et en laboratoire. Cela suggère que les humains partagent les mêmes risques".

L'apparition du concept des perturbateurs endocriniens a soulevé beaucoup de questions et d'hypothèses qui remettent en cause les principes fondamentaux de la toxicologie classique sur quoi est basé tout le système réglementaire des produits chimiques. En

inscrivant ainsi de nouvelles règles qui ouvrent la voie à une nouvelle ère de toxicologie environnementale.

Les deux principales hypothèses sont: "Effets à faibles doses" et "Origine développementale de la santé et des maladies" (DOHaD), qui stipulent que l'exposition aux polluants environnementaux durant différentes périodes de développement, particulièrement la période fœtale "*in utero*", période néonatale, pré-pubertaire et la période pubertaire, peut affecter non seulement l'individu exposé, mais également les enfants ainsi que les générations suivantes, et ce même à de très faibles doses, largement inférieures aux doses réglementaires. Par conséquent, le paradigme classique de la toxicologie change de «Dose fait le poison » vers "Période fait le poison".

Les perturbateurs endocriniens représentent une grande catégorie de substances chimiques de synthèses diverses et variés. Dans le cadre des travaux de cette présente thèse on s'est intéressé à une famille très particulière: les phtalates, en raison de leur utilisation massive dans la plupart des objets de consommation quotidienne et sont considérés, selon plusieurs auteurs, comme les polluants environnementaux les plus abondants. Ces substances issues principalement de l'industrie plastique pour une production mondiale annuelle dépassant les quatre millions de tonnes, sont employées comme des plastifiants ajoutées aux polymères pour les rendre souples, flexibles et durables. Cependant, il ne y a pas de liaisons chimiques covalentes qui se forment entre le polymère et les phtalates, par conséquent, ils sont constamment relégués dans le proche environnement, particulièrement par migration et évaporation, et nous les ingérons quotidiennement. En Europe, de 40 à 60 % des problèmes de fertilité ont été associés à l'exposition aux phtalates, qui sont également considérés, par plusieurs auteurs, l'une des principales causes de la détérioration de la fonction de reproduction mâle.

Le di-(2-ethylhexyl) phtalate (DEHP) est le phtalate le plus abondant dans l'environnement car c'est le plus utilisé par les industriels en raison de ses excellentes propriétés physico-chimiques et son faibles coût. Plusieurs études ont démontré la toxicité du DEHP pour le système de reproduction. Il a été reconnu par les instances réglementaires pour être un perturbateur endocrinien et classé toxique pour la reproduction catégorie 1B, avec une Dose Journalière Tolérable (DJT) de 50µg/kg PC/J, fixée sur la base des études toxicologiques classiques conduites à fortes doses, très loin des doses environnementales. Cependant l'hypothèse des "effets à faibles doses" et celle de DOHaD des perturbateurs endocriniens nous ont conduit à poser la question suivante "*Est ce que les doses environnementales du DEHP (qui sont largement inférieures aux limites réglementaires)*

auxquelles nous sommes exposés quotidiennement dans notre vie peuvent être toxiques pour le système de reproduction des générations exposées directement et celui de leurs descendances qui ne sont pas exposées d'une manière directe à cette substance? ce qui nous emmène à une autre question fondamentale "Est ce que les limites réglementaires du DEHP, basées sur les études toxicologiques à fortes doses nous protègent-elles réellement"?

Pour essayer de répondre à ces questions, nous avons effectué, dans la première partie des travaux de cette présente thèse, une étude trans-générationnelle de reprotoxicité aux doses environnementales du DEHP sur le système de reproduction mâle chez le rat.

Les effets toxiques du DEHP pour la reproduction, son omniprésence dans l'environnement et la multiplicité des sources et voies d'exposition font de son dosage analytique et sa recherche dans les différentes matrices environnementales une exigence primordiale et problématique de santé publique de premier ordre.

Sur le plan analytique, en Algérie, nous sommes confrontés à deux problèmes majeurs: d'une part l'inaccessibilité des détecteurs performants en particulier la spectrométrie de masse avec la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) définie comme méthode de référence par ISO (norme 18856), d'autre part les contaminations environnementales importantes considérées comme contrainte majeure dans l'analyse des phtalates, en plus de l'absence d'une démarche analytique valide avec les bonnes pratiques spécifiques au dosage de ces substances. Dans le temps où les phtalates font l'objet des analyses de routine dans les pays européens et soumises à une réglementation stricte. Par conséquent, les export Algériens ainsi que les industriels agroalimentaires et pharmaceutiques, se trouvent dans l'obligation de les inclure dans le bilan analytique. En outre, l'éventuelle adhésion de l'Algérie à la zone de libre-échange euro-méditerranéenne et l'Organisation Mondiale du Commerce impliquerait le respect des normes internationales spécifiques aux phtalates.

Dans la deuxième partie des travaux de cette présente thèse, nous avons essayé de faire le premier pas dans le développement d'une méthodologie analytique alternative pour le dosage du DEHP, en se focalisant sur la problématique majeure des contaminations environnementales.

CHAPITRE 1

L'APPAREIL REPRODUCTEUR MALE DE RAT

1.1. Généralités

L'appareil reproducteur mâle de rat s'établit et se différencie pendant la vie fœtale, à partir du 13^{ème} jours de gestation [1]. Il se compose principalement de testicules, canaux déférents, épидидymes avec les glandes associées; vésicule séminale et la prostate (Figure1.1) [2]. Les principales fonctions de ces différents organes sont: produire les spermatozoïdes, les transporter vers les épидидymes où ils seront stockés, permettre leur maturation au cours de leur transit épидидymaire et la sécrétion des liquides pour la formation du sperme.

Selon TYL et MARR [1], le développement et le fonctionnement de l'appareil reproducteur mâle est sous le contrôle des hormones, principalement les androgènes. Par conséquent, toutes interférences avec le système hormonal (pendant la période de développement de l'appareil reproducteur) par des substances exogènes, peut avoir des effets néfastes sur l'appareil reproducteur.

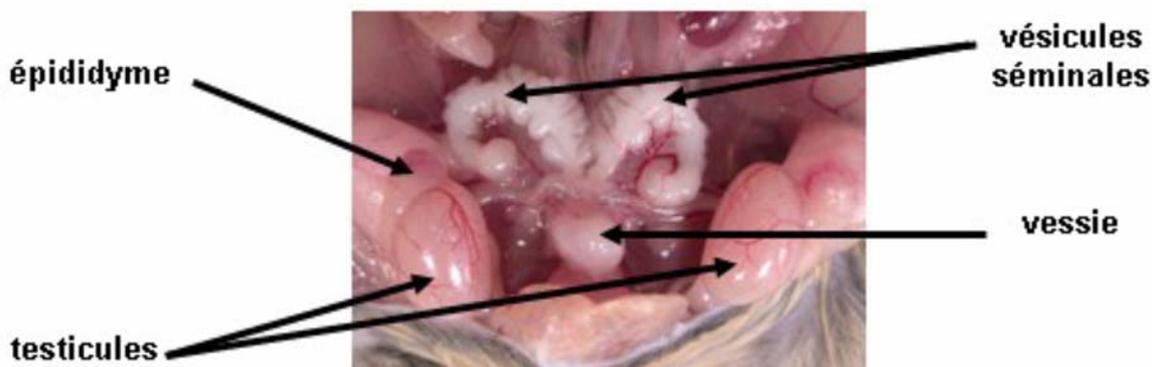


Figure 1.1: Photographie de l'appareil reproducteur d'un rat mâle

1.2. Testicules

Les testicules sont définis par leur forme ovoïde attachés aux canaux déférents qui les lient aux épидидymes [1]. Ils se situent dans le bas de l'abdomen de rat nouveau né, à côté de la vessie, puis ils descendent dans le scrotum à partir du 18^{ème} jour post-natal [2].

1.2.1. Physiologie et fonctions du testicule

Le testicule, d'après ROUILLER-FABRE et al. [3] et PARKER [2] assure deux grandes fonctions : la gamétogenèse et la stéroïdogénèse.

- La gamétogenèse consiste à la mise en place et au développement des cellules germinales pendant la vie fœtale et néonatale et à la spermatogenèse qui commence après la puberté et aboutit à la production de spermatozoïdes.
- La stéroïdogénèse consiste 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 (Figure 1.2):

- Le tissu interstitiel, conjonctif vascularisé (sépare les tubes séminifères), contenant les cellules de Leydig responsables de la production de la testostérone ;
- Les tubes séminifères, de nature épithéliale convolutés , contenant les cellules germinales, les spermatozoïdes et les cellules de Sertoli.

Chez le rat le développement post-natal des fonctions testiculaires se déroule en quatre (4) périodes, selon OJEDA et ses collaborateurs [4] et PARKER [2] ; la période néonatale de la naissance au 7^{ème} JPN, la période infantile du 8 au 21^{ème} JPN, la période pré-pubertaire de sevrage au 35^{ème} JPN, la période pubertaire qui s'étend jusqu'au 42^{ème} JPN et la période péri-pubertaire ou post-pubertaire à partir de 55 au 60^{ème} JPN, lorsque les spermatozoïdes s'observent dans le canal déférent.

1.2.2. Cellules testiculaires

1.2.2.1. Cellules de Sertoli

Selon MUCZYNSKI [5], les cellules de Sertoli sont les premières cellules à se différencier au sein des testicules, ils s'étendent à la périphérie du tubule jusqu'à la lumière (Figure 1.2.D). La prolifération des cellules de Sertoli se déroule pendant trois périodes; pendant la période fœtale de 16^{ème} au 19^{ème} jours de gestation, pendant la période néonatale de 14 au 16^{ème} jours post-natal et pendant la période pré-pubertaire [6, 7].

Le rôle des cellules de Sertoli est de nourrir les cellules germinales, maintenir le contrôle hormonal de la spermatogénèse, ainsi que de faciliter la maturation des cellules germinales en spermatozoïdes en contrôlant l'environnement de la lumière des tubes séminifères [6, 8, 9]. ORTH et al. [10] et SHARPE et al. [11], ont indiqué que la capacité à produire les spermatozoïdes ainsi que leur nombre à l'âge adulte sont déterminés par le nombre des cellules de Sertoli et leur prolifération pendant la période fœtale et pré-pubertaire.

1.2.2.2. Cellules de Leydig

Selon LEJEUNE et al. [12], les cellules de Leydig sont les cellules majoritaires de tissu interstitiel chez le rat (Figure 1.2.D), leur fonction implique au moins deux générations de cellules de Leydig; la première génération développée pendant la vie fœtale, et elle est responsable de la production des androgènes nécessaires à la masculinisation du tractus urogénital du fœtus ainsi qu'à la descente testiculaire sous l'action de la testostérone. La deuxième génération apparaît pendant la puberté, elle est responsable de la sécrétion de la testostérone nécessaire à la spermatogénèse et à la maintenance des fonctions de l'appareil reproducteur. LEJEUNE et al. [12] et MARTY et al. [6], ont signalé que la division des cellules de Leydig immatures commence durant la période pré-pubertaire, de 28 au 56^{ème} jours.

1.2.2.3. Cellules germinales

Globalement la lignée germinale se compose de quatre types de cellules ; Spermatogonies, Spermatocytes, Spermatides et Spermatozoïdes (Figure 1.2.B.C) [2]. Son développement passe par deux phases principales; La première phase pendant la vie fœtale et néonatale et permet la transition de la cellule germinale primordiale (gonie) vers la spermatogonie. La deuxième phase pendant la puberté et représente le cycle de la spermatogénèse qui produit les spermatozoïdes à partir de la spermatogonie [13]. Chez le rat Wistar, les spermatides apparaissent pour la première fois dans les testicules de 20 au 30^{ème} jours après la naissance et les premiers spermatozoïdes apparaissent dans la lumière des tubes séminifères à l'âge de 45 jours et peuvent être détectés dans l'épididyme à partir du 58^{ème} jours [14]. ORTH et al. [10] ont indiqué que la fertilité de l'individu à l'âge adulte dépend du nombre et de la qualité des cellules germinales pendant les périodes; fœtale, pré-pubertaire et pubertaire.

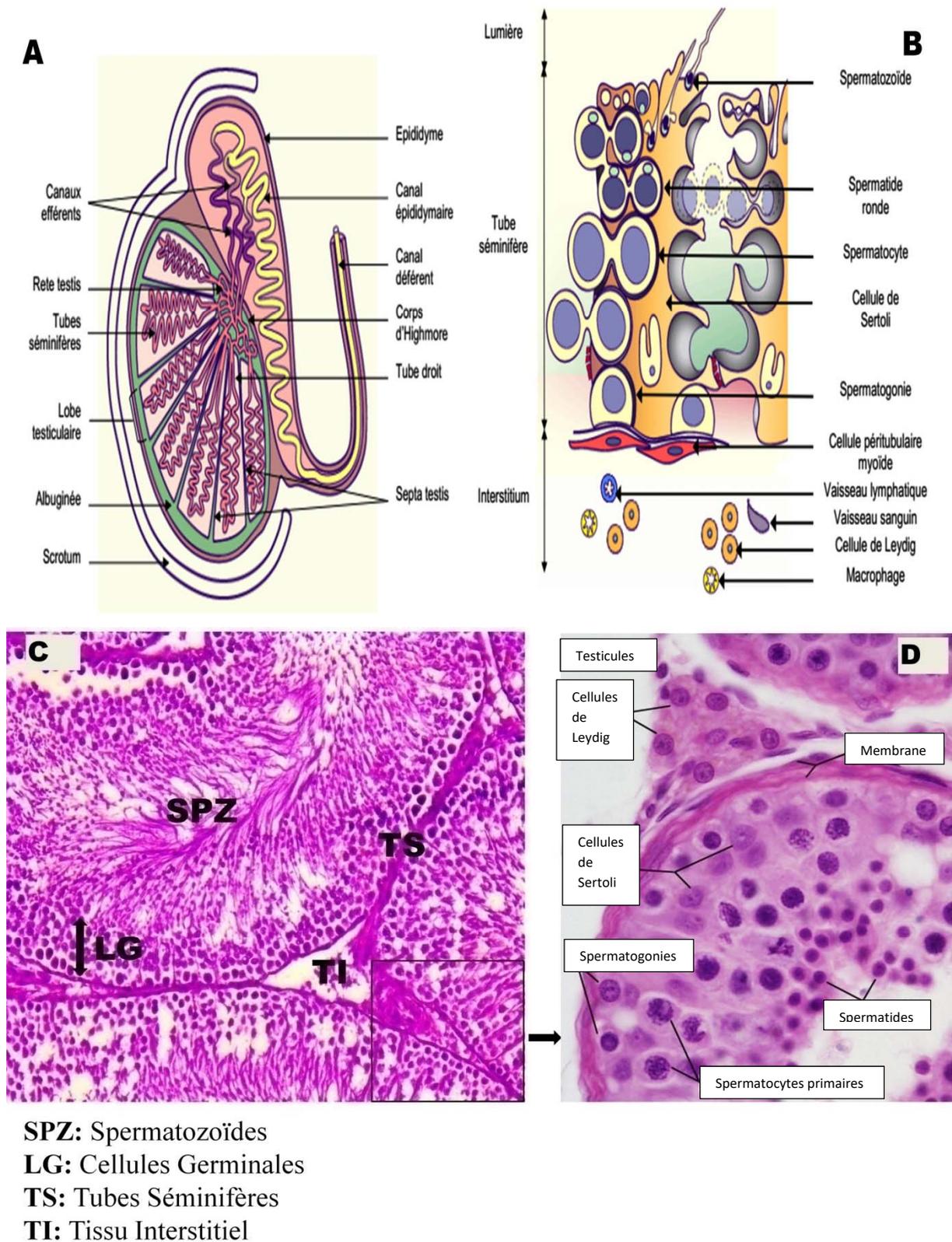


Figure 1.2: A: Coupe longitudinale de testicule. B: Schéma des compartiments tubulaires et interstitiels (FRIRY-SANTINI [15]. C et D: Coupes histologiques de testicule de rat adulte .

1.3. Epididymes

L'épididyme est un long canal unique et très convoluté, bordé d'un épithélium composé de trois segments , le segment initial, caput (tête) située sur le pôle antérieur du testicule, corpus étroit (corps) le long de l'aspect dorsomédial du testicule et le cauda (queue) située sur le pôle postérieur du testicules (Figure 1.3). Chaque segment contribue spécifiquement au microenvironnement essentiel à la maturation des spermatozoïdes qui auront la capacité de féconder lorsque ils atteignent le cauda. Son fonctionnement dépend fortement des androgènes, la Testostérone est impliquée dans la maturation et le transit des spermatozoïdes à travers le canal [2, 16]. Chez le rat, l'épididyme commence à se différencier du 16^{ème} au 44^{ème} JPN [6].

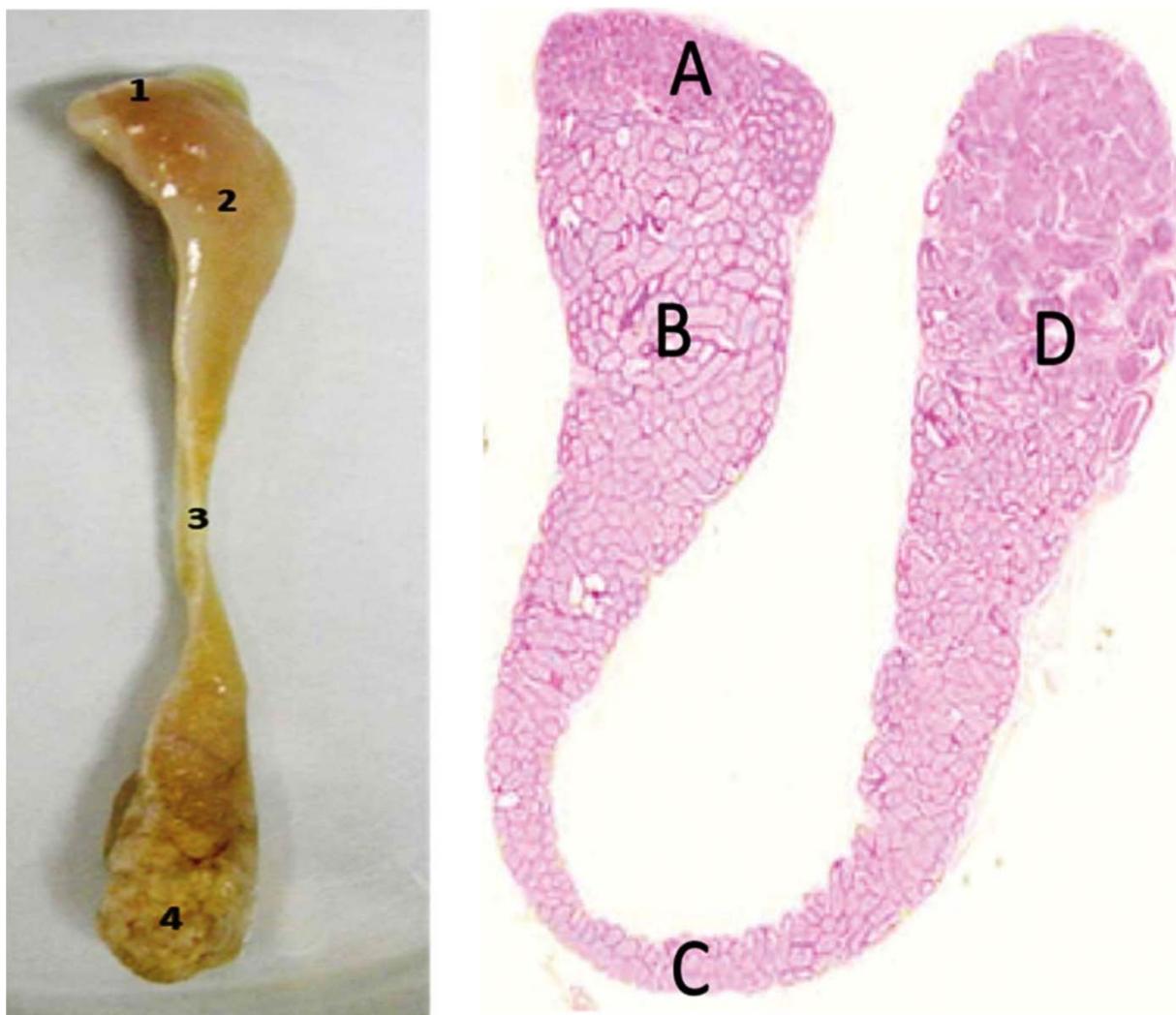


Figure 1.3: Anatomie et section longitudinale (HE) de l'épididyme de rat; A.1: Ségment initial. B.2: Caput. C.3: Corpus. D.4: Cauda. (DE GRAVA KEMPINAS [16])

CHAPITRE 2

ENVIRONNEMENT ET DETERIORATION DE LA SANTE REPRODUCTIVE MASCULINE

2.1. Syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS)

Nous assistons depuis quelques années à une explosion dramatique des maladies de l'appareil reproducteur mâle. Plusieurs études épidémiologiques ont démontré une baisse de la concentration spermatique de 50 à 60 % (figure 2.1) avec l'augmentation de l'infertilité masculine qui atteint 25% dans les pays développés [17-29]. Récemment, en 2017, BOWMAN [30] a indiqué que jusqu'à 40% des jeunes hommes Européens présentent une faible qualité du sperme et ont des difficultés à procréer. Parallèlement, les deux malformations congénitales, cryptorchidie et hypospadias n'ont pas cessé d'amplifier, ces deux malformations sont considérées comme le premier facteur de risque du cancer testiculaire, dont l'incidence ne cesse d'amplifié également [30-32]. En 2018, la société américaine de cancer "The American Cancer Society" a enregistré 9,310 nouveau cas au Etats Unis d'Amérique avec une incidence annuelle de 5.5% [33]. De même, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a signalé que l'incidence du cancer testiculaire dans le monde a triplé ces dernières années [34].

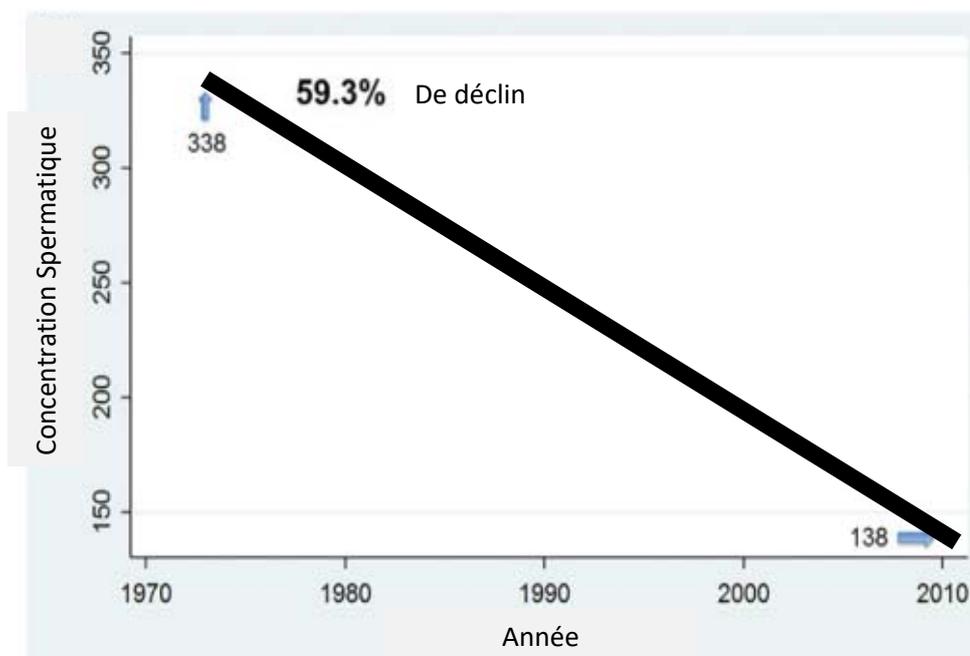


Figure 2.1: Déclin de la concentration spermatique entre 1970 et 2010 [29].

Les causes de ces pathologies restent jusqu'à présent inconnues et mal définies, cependant, un nombre important d'études scientifiques et rapports des instances sanitaires ont associé ces différentes anomalies de l'appareil reproducteur à l'exposition à certains facteurs environnementaux capables d'interférer avec le système endocrinien, en mimant ou en bloquant l'action des hormones naturelles pour donner ainsi une perturbation endocrinienne, désignées sous le nom "Perturbateurs Endocriniens" [17-19, 21-24, 26, 30, 35-59].

Le terme « perturbation endocrinienne » a été inventé 1991 lors de la conférence de Wingspread organisée par THEO COLBORN [60], qui a étudié l'impact de la pollution chimique sur la faune des grands lacs, les résultats ont été publiés dans un livre qui a effrayé le monde scientifique sous le titre "L'HOMME EN VOIE DE DISPARITION" dont les principales déclarations sont:

- "De nombreux composés libérés dans l'environnement par les activités humaines sont capables de dérégler le système endocrinien des animaux, y compris l'homme. Les conséquences de tels dérèglements peuvent être graves, en raison du rôle de premier plan que les hormones jouent dans le développement de l'organisme".
- " De nombreuses populations des animaux sauvages sont déjà affectées par les polluants chimiques, les effets incluent le mauvais fonctionnement de la thyroïde chez les oiseaux et les poissons ; une baisse de fertilité chez les oiseaux, les poissons, les coquillages et les mammifères ; une diminution des éclosions chez les oiseaux, les poissons et les tortues ; des malformations grossières à la naissance chez les oiseaux, les poissons et les tortues ; des anomalies du métabolisme chez les oiseaux, les poissons et les mammifères; la féminisation des mâles chez les poissons, les oiseaux et les mammifères ; des anomalies de comportement chez les oiseaux : la masculinisation des femelles chez les poissons et les oiseaux ; des déficits immunitaires chez les oiseaux et les mammifères".
- Les humains sont également affectés par ces composés. Le distilbène, un médicament de synthèse, et beaucoup de composés cités en note ont des effets oestrogéniques. Les femmes dont les mères ont ingéré du distilbène sont particulièrement touchées par le cancer du vagin, par diverses malformations de l'appareil reproducteur, par des grossesses anormales et des modifications de la réponse immunitaire. Les hommes et les femmes exposés pendant leur vie prénatale présentent des anomalies congénitales de l'appareil reproducteur et une baisse de fertilité. Les effets observés chez les victimes du distilbène sont semblables à ce que l'on observe chez les animaux

contaminés, dans la nature et en laboratoire. Cela suggère que les humains partagent les mêmes risques.

L'ensemble de ces différentes constatations ont conduit SKAKKEBAEK [32] et SHARPE [31] à la formulation de l'hypothèse qui stipule que les différentes anomalies de l'appareil reproducteur mâle: baisse de la concentration spermatique, cryptorchidie, hypospadias et cancer testiculaire, sont les symptômes d'une seule pathologie qui est le "syndrome de dysgénésie testiculaire" (TDS), induite par des polluants environnementaux qui perturbent le développement testiculaire pendant la vie fœtale.

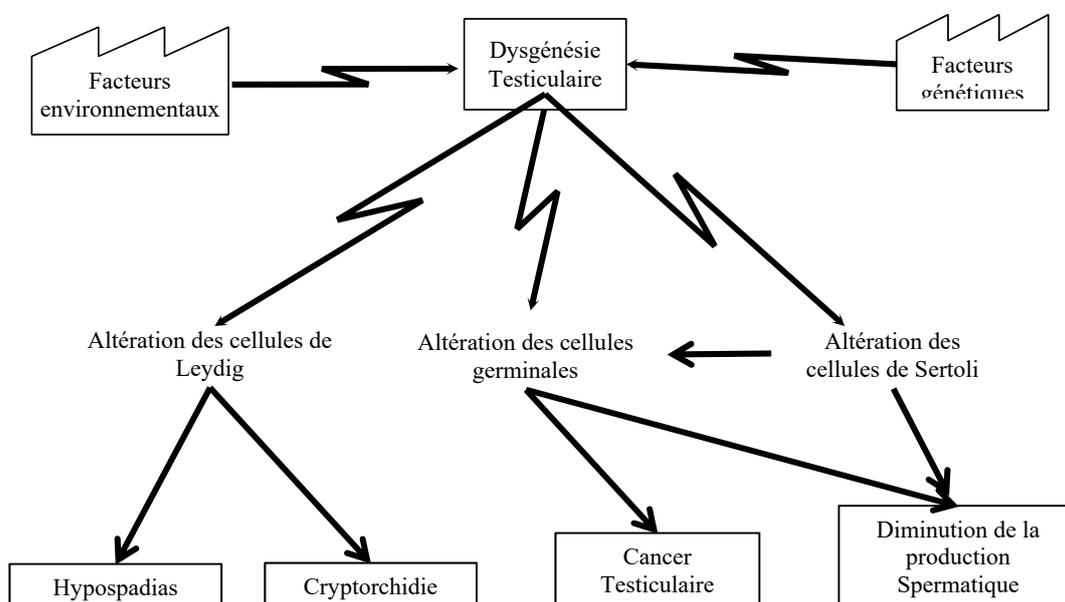


Figure 2.2: Hypothèse d'origine du syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS)
(SKAKKEBAEK [32])

2.2. Perturbateurs endocriniens et changement de paradigme

Défini par l'OMS comme " 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" [17, 61], les perturbateurs endocriniens ont soulevé plusieurs hypothèses qui remettent en cause les règles classiques de la toxicologie fondamentale et imposent de nouvelles règles de toxicologie environnementale qui suggère l'impact de l'environnement sur la santé reproductive.

2.2.1. Effets à faibles doses

L'hypothèse des "effets à faibles doses" est actuellement au cœur des débats scientifiques et politiques, car elle remet en cause le principe fondamental de la toxicologie classique "dose fait le poison", sur quoi est basé tout le système réglementaire des produits chimiques qui fixe des limites sans risques "safe dose", au dessous desquelles la santé du consommateur n'est pas en danger!. En effet plusieurs auteurs ont observé que l'exposition à de très faibles doses de certains perturbateurs endocriniens notamment le distilbène (DES), le bisphénol A (BPA) et les phtalates, pendant la grossesse, provoque des effets toxiques graves sur les enfants, par exemple pour le DES, ils ont observé des cancers gynécologiques chez les enfants dont les mamans ont été traitées par de faibles doses de DES [28, 62-65].

L'hypothèse de "faibles doses", stipule que l'exposition aux "perturbateurs endocriniens", pendant les périodes critiques de développement (fœtale, néonatale, pré-pubertaire et pubertaire) peut entraîner des effets toxiques à de très faibles doses, largement inférieures aux limites réglementaires, mais pas nécessairement à certaines doses plus élevées. Elles ne suivent donc pas la courbe classique des réponses linéaires "dose réponse", mais un autre type de courbes doses-réponses non monotoniques, sous forme de "U" ou "U" inversé" ou encore une courbe multiphasique (figure 2.3). Ces réponses ont conduit à la formulation de concept "courbes doses-réponses non monotoniques "nonmonotonic dose-response curves" (NMDRCs) des perturbateurs endocriniens. Par conséquent, le paradigme classique de la toxicologie change de "la dose fait le poison" vers "la période fait le poison" [17, 28, 51, 61-69]. Ainsi aucune limite réglementaire n'est valable pour les perturbateurs endocrines et tout le système réglementaire doit être revu!

Le terme « faibles doses » se définit en deux notions, selon "National Toxicology Program" (NTP) [62]

- Doses inférieures aux doses réglementaires "*No Observable Adverse Effect level* (NOAEL) et "*Low Observable Adverse Effect level*" (LOAEL) ;
- Doses réelles auxquelles l'Homme est exposé quotidiennement dans son environnement ;

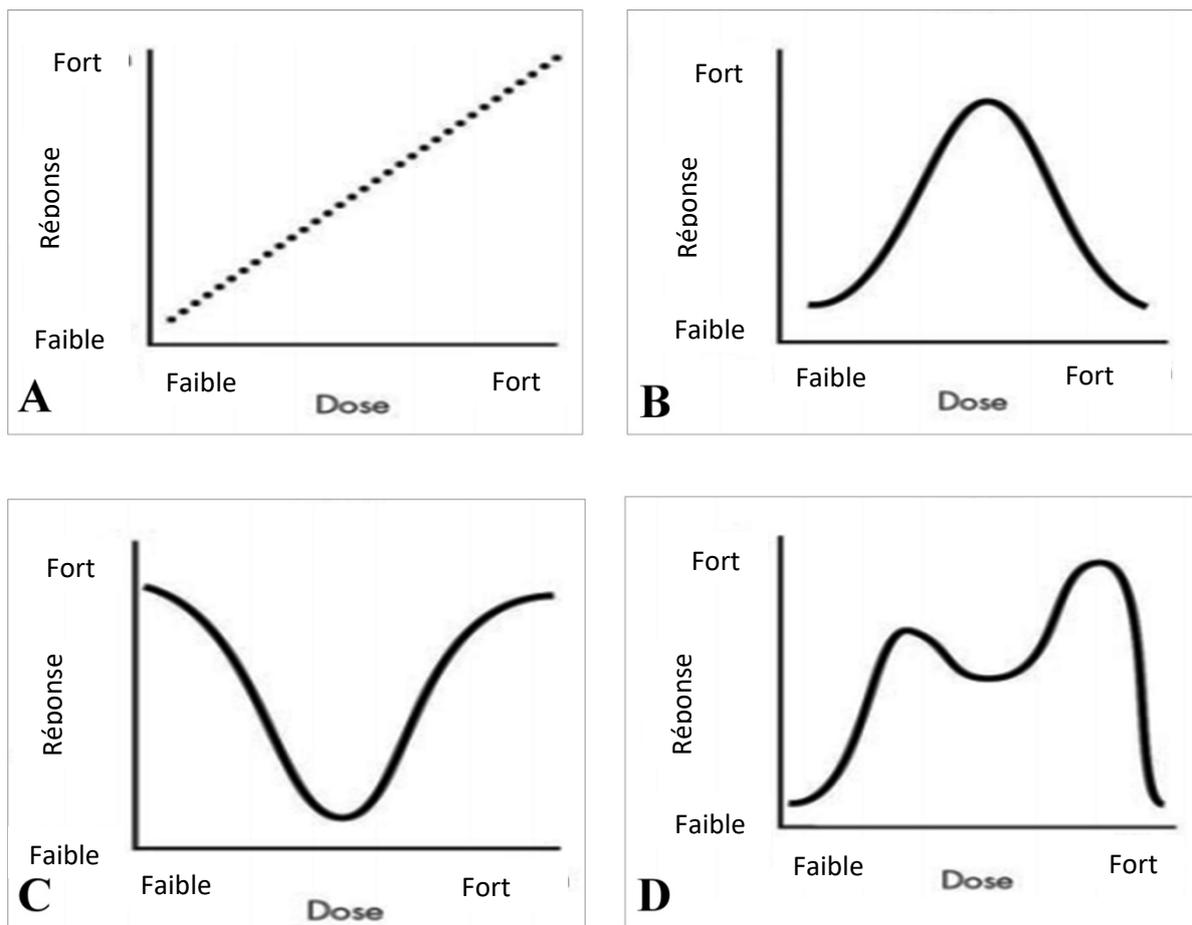


Figure 2.3: Exemples de courbes dose-réponse. A: courbe linéaire qui suit le principe "dose fait le poison" . B, C, D: Courbes doses-réponses non monotoniques; B en forme de "U" inversé, C en forme "U", D en forme multiphasique. VANDENBERG [64].

2.2.2. Impact de la période d'exposition

Comme nous l'avons signalé ci-dessus, l'hypothèse des "effets à faibles doses" a soulevé la sensibilité particulière de certaines périodes d'exposition. Il a été démontré que la période de développement du système reproducteur mâle qui inclue (*in utero*, pré-pubertaire et pubertaire) est la plus sensible aux perturbations endocriniennes par les facteurs environnementaux comme le DES, BPA et DEHP [22, 70]. En effet, le système reproducteur mâle et la différenciation sexuelle s'installe pendant la vie fœtale de 13^{ème} GD au 19^{ème} jour de gestation sous le contrôle des hormones (testostérone). La période pré-pubertaire se caractérise par la prolifération des cellules de Sertoli installées pendant la vie fœtale. Ces cellules déterminent la capacité à produire les spermatozoïdes, la perturbation de leur prolifération pendant la période pré-pubertaire affecte la concentration de spermatozoïdes à l'âge adulte [7, 25, 26, 71]. La période pubertaire se caractérise par une immense activité hormonale dont l'installation de la deuxième couche de cellules de Leydig, responsables de la

synthèse de la testostérone nécessaire au déclenchement de la spermatogénèse [12]. Cette dernière, dont un cycle complet dure environ 70 jours chez le rat, conduit à la production des spermatozoïdes à l'âge adulte [2].

2.2.3. Origines développementales de la santé et des maladies "The Developmental Origins of Health and Disease" (DOHaD)

Cette hypothèse stipule que l'exposition aux polluants environnementaux durant les périodes les plus sensibles de développement, particulièrement la période fœtale "in utéro", période néonatale, pré-pubertaire et la période pubertaire, peut affecter non seulement l'individu exposé directement, mais également les enfants ainsi que les générations suivantes [30, 51, 72-78].

Le DOHaD se caractérise par les effets multi et trans-générationnels (Figure 2.2), la différence entre les deux réside dans l'exposition directe ou non de la génération affectée, selon XIN [78] :

2.2.3.1. Effets multi-générationnels: Lorsque une maman en période de grossesse, désignée par "F0" est exposée à un perturbateur endocrinien "PE", son enfant désigné par "F1" peut être affecté par une exposition directe au même "PE" (par voie placentaire que nous allons aborder au 3^{ème} chapitre). De plus, le petit enfant désigné par "F2" serait également exposé directement au même "PE" par ce qu'il est le fruit de fécondation par la lignée germinale de "F1" qui a été exposé directement "*in utéro*", donc les effets sont considérés multi-générationnels.

2.2.3.2. Effets trans-générationnels: Les effets observés à la 3^{ème} générations "F3" issue de "F2" sont considérés comme trans-générationnels par ce que "F3" n'est pas exposé directement au "PE". Lorsque la génération paternelle "F0" est également exposé au "PE", les effets sont considérés trans-générationnels à partir de la génération "F2".

La majorité des recherches sur les effets trans-générationnels des perturbateurs endocriniens se sont focalisées sur l'exposition maternelle, pendant la grossesse (*in utéro*), et ses effets sur le génome mâle du fœtus qui transmettrait les effets aux générations futures [72, 73, 79]. Certains auteurs ont cependant signalé que l'exposition paternelle aux facteurs environnementaux avant l'accouplement, pendant la spermatogénèse dans le testicule ou pendant la maturation spermatozoïdes dans l'épididyme, peut également affecter le génome mâle paternel qui transmettrait des effets trans-générationnels (comme une diminution du nombre de spermatozoïdes et l'infertilité masculine, avortements spontanés, malformations

congénitales ou même le cancer) à la lignée germinale des futures générations [80, 81]. HALES et al.[81], ont indiqué que l'exposition paternelle contribue avec environ 60% de malformations congénitales de la descendance. Les transmissions trans-générationnelles, selon, ANWAY et al.[72] et SKINNER et al.[79] se font via un mécanisme épigénétique qui change l'expression des gènes le plus souvent par la méthylation de l'ADN (Ajout d'un groupement méthyle (-CH₃) sur le cinquième carbone de l'anneau pyrimidine de la cytosine), sans pour autant modifier la séquence de ce dernier (ADN). selon les mêmes auteurs, deux gènes ont été identifiés sur les spermatozoïdes seraient responsable des transmissions trans-générationnelles.

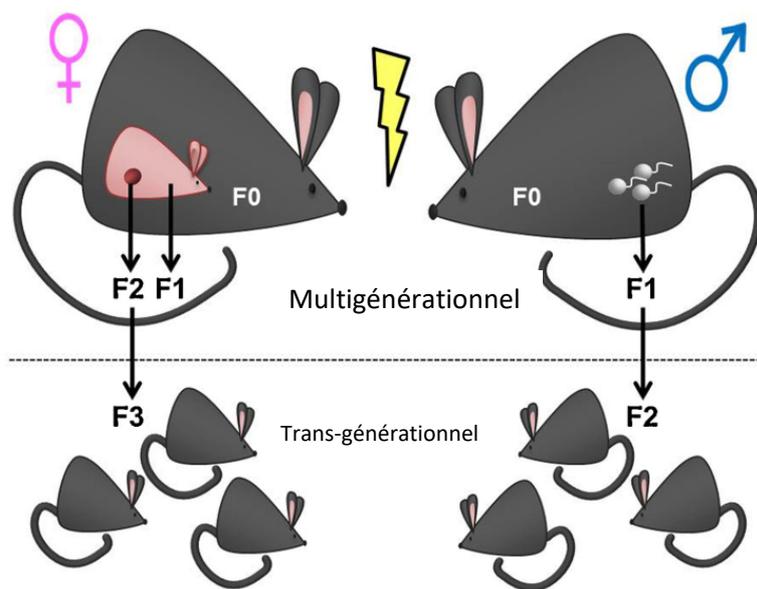


Figure 2.4: Effets Multi et trans-générationnels transmis par l'exposition paternelle et maternelle "F0" au "PE" (XIN [78])

2.2.4. Effet Cocktail

Une autre approche fondamentale de la toxicologie classique qui consiste aux études de toxicité des substances prises individuellement, est également remise en cause par les "PE" qui ont conduit à la formulation d'hypothèse "effet cocktail" des différents polluants environnementaux impliqués en même temps et peuvent avoir ensemble plusieurs effets synergiques ou cumulatifs, ce qui implique l'imprévisibilité de l'effet d'un PE en mélange ($0+0+0 \neq 0$) particulièrement pendant les périodes sensibles de développement [82-84].

Chaque année, environ 140000 molécules de synthèses sont mises sur le marché, dont 800 molécules sont reconnues pour être des perturbateurs endocriniens aux quels nous sommes quotidiennement exposés [82]. Dans le cadre des travaux de cette présente thèse, nous avons choisi de travailler sur les "phtalates" en raison de la large utilisation des matières plastiques dans notre vie quotidienne, la multiplicité des sources et voies d'exposition ainsi que leur omniprésence dans notre environnement.

CHAPITRE 3

LES PHTALATES

3.1. Généralités

Les phtalates, selon l'office fédéral de la santé publique (OFSP) [85], sont des plastifiants, ils rendent le plastique souple et flexible. Ils 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. Ils sont issus de l'industrie pétrolière par estérification d'un acide phtalique avec un ou plusieurs alcools et caractérisés par une structure chimique incluant un cycle benzénique substitué en ortho par deux groupements carboxylates dont la taille des chaînes alkyles est variable (Tableau 2.1) [39]. Produits pour la première fois dans les années 1920, ils ont connu un essor très important dans les années 1950, lorsque le poly chlorure de vinyle (PVC) est apparu [86].

Selon le Conseil Européen des Plastifiants et Intermédiaires (ECPI) [87] les phtalates se divisent en deux sous groupes (Tableau 3.1) :

- Les phtalates à longue chaîne moléculaire ou « phtalates longs », comme le DINP et le DIDP (tableau 3.1), constituent plus de 80% des phtalates utilisés en Europe. Ces molécules sont enregistrées par la réglementation européenne "Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals" (REACH) et ne sont pas classifiées comme substances à risque pour la santé ou l'environnement.
- Les phtalates à courte chaîne moléculaire ou « phtalates courts », tels que le DBP, le BBP, le DIBP et le DEHP (tableau 3.1), sont reconnus comme « substances extrêmement préoccupantes » par REACH en raison de leurs effets sur la reproduction observés dans le cadre d'études menées sur des animaux.

Tableau 3.1 : Identité des principaux phtalates (NICNAS [44], INSERM [39], ECPI [87])

R ₁	R ₂	Nom	PM (g/mol)	Exemples d'utilisations
Phtalates courts				
C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	Diéthyl-phtalate (DEP)	222,2	
C ₈ H ₁₇	C ₈ H ₁₇	Di (2-éthyl-hexyl)- phtalate (DEHP)	390,6	
C ₄ H ₉	C ₇ H ₇	Butylbenzyl-phtalate (BBP)	298,3	
C ₄ H ₉	C ₄ H ₉	Dibutyl-phtalate (DBP)	278,3	
Phtalates longs				
C ₉ H ₂₀	C ₉ H ₂₀	Diisononyl-phtalate (DINP)	418,6	
C ₁₀ H ₂₁	C ₁₀ H ₂₁	Diisodécyl-phtalate (DIDP)	447,0	
Formule chimique				

3.2. Di (2-éthylhexyl) phtalate (DEHP)

Le DEHP est un ester ramifié de la famille des phtalates, de formule chimique $C_{24}H_{38}O_4$ et numéro CAS: 117-81-7 [86, 88, 89]. Il est considéré depuis plus d'une trentaine d'années comme le plastifiant standard du marché des plastifiants, il est très apprécié pour les propriétés mécaniques qu'il confère au PVC et pour la facilité de sa transformation ainsi que pour son très bon rapport qualité prix [87].

3.2.1. Propriétés physico-chimiques

Les principales propriétés physico-chimiques du DEHP sont présentées dans le tableau suivant ;

Tableau 3.2: Propriétés physico-chimiques du DEHP (CIRC monographie [89]).

Forme physique	Liquide huileux très peu volatil, incolore, odeur très faible.
Poids moléculaire ($g \cdot mol^{-1}$)	390,57
Point d'ébullition ($^{\circ}C$)	384
Point de fusion ($^{\circ}C$)	-55
Pression de vapeur (mm Hg à $25^{\circ}C$)	1.42×10^{-7}
Densité (g/cm^3 à $25^{\circ}C$)	0,981
Coefficient de partage : Octanol/eau:	$\log K_{ow}$, 7.6
Solubilité	Peu soluble dans l'eau (0,27mg/l à $25^{\circ}C$), soluble dans les solvants organiques et dans le sang.

La faible solubilité du DEHP dans l'eau et son caractère hydrophobe est l'un des paramètres les plus importants qui limite sa migration et sa répartition dans les différents milieux et compartiments environnementaux aqueux. De même, son caractère lipophile favorise sa migration et son accumulation dans les milieux gras et organiques. La pression de vapeur relativement élevée est un autre paramètre qui favorise la volatilisation du DEHP dans l'atmosphère.

3.2.2. Production

Selon INRS [90], la production mondiale du DEHP était estimée à 2 millions de tonnes (t) en 2002, 340 000 t en 2007 et serait inférieure à 100 000 t en 2013. Sur la base des données disponibles en 2017, REACH [91], a signalé l'enregistrement de 10 000 à 100 000 tonnes par an.

3.2.3. Usage

Le DEHP est un agent polyvalent très utilisé dans la plupart des produits de consommations courantes, trois (3) principales applications ont été identifiées en Europe [17, 46, 52, 89, 92] :

- 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), Dispositifs médicaux, puériculture (jouets) et cuirs synthétiques, avec des concentrations de 1 à 40%;
- Plastifiant de polymères 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, encres et enduits d'étanchéité.

Plusieurs auteurs rapportent également l'utilisation du DEHP comme plastifiant dans :

- Le polyéthylène téréphtalate (PET) [93-96], en effet les auteurs ont signalé la présence quasi-systématique du DEHP dans les eaux embouteillées en PET [93, 97, 98].

Dans un scandale alimentaire en 2013, YANG et ses collaborateurs [99], ont rapporté l'utilisation, illégale, du DEHP comme agent émulsifiant et épaississant dans 965 produits alimentaires en Chine.

3.2.4. Sources de contamination et voies d'expositions

3.2.4.1. Contamination de l'environnement

En raison de l'absence de liaison chimique covalente avec le polymère, le DEHP est constamment relargué dans l'environnement par migration ou évaporation, pendant différents stades: fabrication, transport, utilisation, dégradation et/ou recyclage des produits finis. Toutes ces étapes conduisent à son omniprésence dans l'environnement [100, 101].

Selon l'office fédéral de l'environnement (OFEV) [102], les principales voies d'apport des phtalates à l'environnement sont :

- Les émissions dans l'air (volatilisation), dégradation des produits en PVC au niveau d'industries, ou autre, en contenant dans leur composition ;
- les pertes par lessivage et/ou solubilisation (ruissellement sur les toitures et les chaussées lors des phénomènes pluvieux, nettoyage de véhicules, de surfaces

intérieures, etc), permettent par la suite aux phtalates de se retrouver dans les eaux, les sols et les sédiments.

En générale, d'après l'INRS [90], les sources de contamination environnementale peuvent être ponctuelles ou diffuses.

- Les sources ponctuelles : sont les émissions lors de la production de phtalates, lors de la production de PVC et de polymères ainsi que lors des usages industriels du PVC. Elles représentent de 5 à 10 % des rejets à l'environnement.
- Les sources diffuses : sont beaucoup plus importantes (90 à 95 %) et comprennent les émissions de phtalates lors de l'utilisation de produits finis ainsi que la dégradation de déchets (incinération, décharges, démantèlement de véhicules).

L'émission totale du DEHP dans l'environnement a été estimée à 28 653 tonnes en Europe [103]. Par conséquent la population générale est constamment exposée au DEHP à travers différentes et multiples sources et voies d'expositions.

3.2.4.2. Sources et voies d'exposition des populations

L'exposition humaine au DEHP est très importante et suscite beaucoup d'inquiétude en raison de sa très large utilisation qui conduit à son omniprésence dans l'environnement, ainsi qu'en raison de la multiplicité des sources et voies d'exposition, les principales sont présentées ci-dessous et illustrées sur la figure suivante :

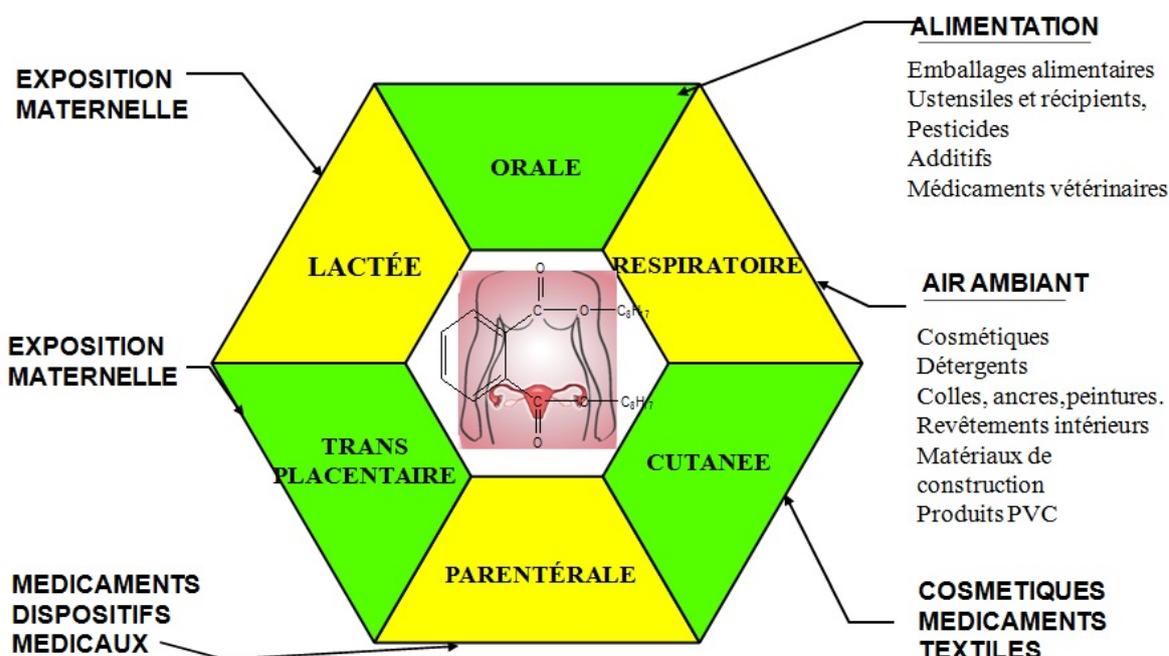


Figure 3.1: Sources et voies d'exposition humaine au DEHP

3.2.4.2. 1. Voie orale (Ingestion)

L'alimentation est considérée comme la principale source d'exposition humaine au DEHP par voie orale [25, 39, 89, 101, 104-106]. Les aliments gras se sont avérés être les plus contaminés. En effet, des valeurs de 20 000 à 120 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ du DEHP ont été quantifiées dans le lait en poudre, 200 à 16 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans les fromages, 200 à 2700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans les crèmes et 2500 à 7400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans le beurre [104]. La quantification du DEHP dans l'huile d'olive extra vierge et dans les huiles de table a révélé des concentrations de 280 à 4700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et de 340 à 1640 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivement [107-109]. Dans la nourriture pour enfant, considéré comme individu à risque et plus sensible, de 110 à 630 $\mu\text{g}/\text{kg}$ du DEHP ont été rapportés [89, 104]. Dans les autres aliments moins gras, 2200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ont été rapportés dans les fruits et les matières premières agricoles (grains) [25]. De 311 à 517 $\mu\text{g}/\text{kg}$ du DEHP dans les concombres et les tomates, environs 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans les aliments secs (céréales, biscuits, pain..) [104]. Les aliments aqueux à leur tour n'ont pas échappé aux contaminations par le DEHP malgré son caractère hydrophobe. 97.8 $\mu\text{g}/\text{L}$ ont été rapportés dans les eaux de surfaces et 5.661 $\mu\text{g}/\text{L}$ dans les eaux sous-terraines [110]. Les concentrations dans les eaux minérales seront exposées dans le 4^{ème} chapitre. Selon KOCH et al [111], l'apport du DEHP via l'alimentation a été estimé à 13.8 à 52.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Chez les enfants, en plus de l'alimentation, les tétines et les jouets en plastique contenant jusqu'à 40% du DEHP, constituent une autre source de contamination très importante par voie orale, notamment du fait qu'ils ont tendance à les porter à la bouche pour les mâcher et les sucer.

Malgré l'enjeu important de santé que présente le DEHP dans les aliments, sa quantification et son dosage reste limités à certains pays occidentaux (USA, Espagne, Allemagne, Danemark) en raison des difficultés analytiques qui seront présentées dans le 4^{ème} chapitre de cette présente thèse.

En raison de la large utilisation du DEHP et son omniprésence dans l'environnement, la contamination des aliments peut avoir lieu à travers de multiples sources et durant les différents stades de leur vie: chaîne de production (matières premières, ustensiles en plastique, gants, additifs, air ambiant...), conditionnement et emballage plastique et carton, pendant les traitements thermiques (pasteurisation et stérilisation), transport, stockage et pendant la préparation domestique et consommation (réchauffement dans des boîtes plastiques, contamination via l'air ambiant, additions des adjuvants contaminés). CIRILLO et COCCHIERI [104], ont indiqué que le contact avec l'air ambiant, les surfaces, les récipients, les gants et les ustensiles tout au long de la chaîne de fabrication, est une source importante

de contamination. Par ailleurs, selon l'INSERM [39], MORET [105] et CIRILLO et COCCHIERI [104], l'emballage alimentaire, plastique, carton, papier et verre avec joints, est la principale source de contamination des aliments.

Le degré de contamination des aliments par le DEHP via l'emballage, comme nous l'avons préalablement démontré dans mon travail de master, varie en fonction de plusieurs paramètres:

1. Nature du milieu (aliment) : les aliments gras ont plus d'affinité au DEHP en raison de son caractère lipophile, nous avons observé la migration de 90% de la substance dans les milieux gras, par rapport aux milieux aqueux qui ont montré une faible contamination en raison de caractère hydrophobe du DEHP.
2. Température: les conditions de température sont un paramètre très important qui favorise ou limite la migration du DEHP, plus la température augmente plus la migration ou la contamination est importante.
3. Durée de contact: Plus la durée de contact avec l'emballage est importante plus la migration est importante.

Les pratiques agro-alimentaires, à savoir; utilisation de pesticides et des boues fortement chargées en DEHP, les tuyaux d'arrosage en PVC, les eaux contaminées et différents récipients en plastiques, en plus de l'air ambiant, s'avèrent également comme une source importante de contamination des aliments [98, 104]. En effet, SATHYANARAYANA et al [112], ont indiqué que même les aliments biologiques ou préparés artisanalement, cuits et conservés dans des contenants sans plastique sont contaminés par le DEHP en raison de la contamination de l'ensemble de la chaîne alimentaire et tout l'environnement.

3.2.4.2.2. Voie respiratoire (Inhalation)

Selon MUCZYNSKI [5], l'inhalation du DEHP contenu dans l'air ambiant constitue la deuxième source importante d'exposition. 546 tonnes sont libérés dans l'air en Europe [103] et 72 tonnes aux USA [89]. D'après des données Allemandes, la concentration du DEHP dans l'air intérieur des maisons et dans la poussière a été estimée à 191 ng/m³ en moyenne et 703 mg/kg, respectivement [89, 104]. Cette contamination est généralement due à la volatilisation du DEHP à partir de différents objets internes; matériaux de construction, revêtements, câbles, jouets et tout autre objet en plastique. L'inhalation d'aérosols issus de; cosmétiques (parfums, déodorants), de détergents et colles est également une source non négligeable [98].

3.2.4.2.3. Voie cutanée

L'application de certains médicaments (pommades) et produits cosmétiques; crèmes solaires et hydratantes, shampoings, déodorants, lotions, ainsi que le contact direct avec; détergents, vêtements et jouets, sont considérés comme une source importante d'exposition par voie cutanée particulièrement pour les enfants [104, 113].

3.2.4.2.4. Voie parentérale

Les dispositifs médicaux en PVC (poches à sang, tubulures, cathéters..) contenant jusqu'à 50% du DEHP sont une source importante de contamination par voie parentérale [89, 104, 114].

Les prématurés, nouveaux nés hospitalisés en néonatalogie, enfants et adolescents pré pubères hospitalisés en soins intensifs, en hémodialyse ou en traitement de longue durée ont été identifiés comme population à risque dans le milieu hospitalier, par l'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, en raison de leur sensibilité particulière et la multiplicités des soins reçus, utilisant des dispositifs médicaux contenant du DEHP (matériel de nutrition entérale, matériel de perfusion, cathéter central ombilical, systèmes de transfusion d'hémodialyse) [114].

3.2.4.2.5. Voies trans-placentaire et lactée

Il a été démontré par plusieurs auteurs que le DEHP passe dans le lait maternel et traverse la barrière placentaire pour contaminer le fœtus via l'exposition maternelle [25, 39, 89, 112, 114].

3.2.5. Exposition générale de population

VANDENBERG et al. [64], ont estimé l'exposition humaine au DEHP à 0.5 - 25 µg/kg PC/j, et récemment en 2017, LEE et al [115], ont rapporté des valeurs plus élevées, de 0.4 à 52.9µg/kg PC/j.

3.2.6. Métabolisme et élimination

Une fois dans l'organisme, le DEHP est métabolisé à une vingtaine de métabolites. Il 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 [88].

Selon l'INSERM [39], les métabolites, MEHP en particulier, sont souvent plus toxiques que la molécule de départ (DEHP). Par ailleurs, LATINI et al. [43], ont indiqué que les métabolites secondaires du DEHP sont jusqu'à 100 fois plus toxiques que le MEHP.

3.2.6.1. Demi-vie

Sous sa forme libre, le DEHP a une demi-vie sanguine courte de l'ordre de 28 minutes et le MEHP a une demi-vie sanguine supérieure à 3 heures [90]

3.2.6.2. Elimination

L'avantage des phtalates c'est qu'ils ne s'accumulent pas dans l'organisme, les métabolites sont éliminés pour une grande partie dans les urines (74,2 % de la dose du DEHP ingérée) [90]. Le lait maternel et la distribution placentaire sont également des voies d'élimination du DEHP de l'organisme de la maman [39].

Malgré l'élimination presque totale, il est important de signaler que l'exposition est continue en raison de l'omniprésence dans l'environnement et la multiplicité des sources d'exposition, ce qui conduit à une présence constante et permanente du DEHP dans l'organisme.

3.2.7. Limites réglementaires et classification

3.2.7.1. Limites réglementaires

Une Dose Journalière Tolérable (DJT) de 50 µg/kg PC/jour du DEHP a été établie par "European Food Safety Authority" (EFSA) en 2005 [116], en se référant à la dose sans effets observables chez l'animal NOAEL, de 5 mg/kg PC/j fixée par WOLFE et LAYTON [117], dans leur étude multi-générationnelle de toxicité pour la reproduction. Par ailleurs le règlement REACH "*Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals*" [118] de l'Union Européenne a établi des niveaux sans effet "Derived No Effect Level" (DNEL) pour la population générale en fonction des voies d'exposition:

- DNEL voie orale: 36 µg/kg PC/jour
- DNEL voie cutanée: 720 µg/kg PC/jour
- DNEL voie respiratoire : 130 µg/m³

Concernant les limites du DEHP dans les aliments, à l'exception des eaux potables dont le seuil a été fixé à 8 µg/L par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [119], il n'existe pas, jusqu'à présent, de textes réglementaires qui les fixe, en raison des difficultés analytiques d'une part, et la complexité des matrices alimentaires d'autre part. Par ailleurs, le règlement de la Commission Européenne "CE n°10/201" [120], sur "les matériaux et objets en

matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires", 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 $\leq 0,1\%$.

3.2.7.2. Classifications réglementaires

Pour une première dans l'histoire de la réglementation des produits chimiques, l'Union Européenne vient de reconnaître officiellement, le jeudi 16 février 2017, le DEHP (avec DIBP, DBP, BBP) comme étant une substance extrêmement préoccupante pour l'Homme, en raison de son caractère perturbateur endocrinien. Par conséquent les quarts phtalates (DEHP, DIBP, DBP, BBP) ont été inclus sur la liste des substances extrêmement préoccupantes (SVHC) du règlement REACH, en raison de leur caractère perturbateur endocrinien pour l'Homme [121]. En outre, le DEHP a été classé en tant que substance toxique pour la reproduction catégorie 1B (Averé pour l'animal et suspecté pour l'homme) par le règlement de la commission européenne 1272/2008 (règlement CLP "Classification, Labelling and Packaging" relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges) sur la base des études de reprotoxicité sur les animaux [122]. Le DEHP est également soumis à l'obligation d'autorisation par le règlement REACH. Le tableau suivant présente les différentes classifications réglementaires du DEHP.

Tableau 3.3: Classifications réglementaires du DEHP (IRAC [89] et REACH [122])

Mutagénicité	Non classé
Cancérogénicité	-UE : non classé -IARC : Groupe 2B: Cancérogénicité possible pour l'Homme
Toxicité pour la reproduction	- CLP : Catégorie 1B : Substances présumées toxiques pour la reproduction humaine (phrase de risque H360FD : peut nuire à la fertilité peut nuire au fœtus.
Pictogramme de danger selon le règlement CLP	
	

3.2.8. Effets du DEHP sur la santé reproductive mâle

3.2.8.1. Effets chez l'Homme

Comme nous l'avons précédemment cité, pour la première fois dans l'histoire de la réglementation des produits chimiques, l'Union Européenne vient de reconnaître le DEHP comme étant un perturbateur endocrinien pour l'Homme, et l'inscrit dans la liste des substances hautement préoccupantes, en raison de ses effets néfastes sur l'appareil reproducteur mâle humain [121]. En effet, plusieurs études épidémiologiques [17-22, 26, 28, 38, 40, 41, 43, 47-50, 54, 55, 101, 123-126], ont démontré le lien entre l'exposition au DEHP et les anomalies de l'appareil reproducteur mâle, particulièrement:

- Cancer testiculaire;
- Cryptorchidie;
- Hypospadias;
- Inhibition de la testostérone;
- Diminution de la distance anogénitale
- Féminisation des mâles;
- Organe génitale plus court;
- Baisse de fertilité;
- Baisse de la concentration spermatique;

Ces différentes anomalies sont regroupées, selon SWAN [54], sous le nom "*syndrome phtalate*" qui serait similaire au syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS) observé chez l'homme [31, 32, 127].

Les effets DEHP sur la fertilité masculine ont suscité beaucoup d'inquiétudes et ont attiré une attention très particulière du grand public, des instances sanitaires et réglementaires ainsi que la communauté scientifique, en raison de la large utilisation de cette substance, son omniprésence dans l'environnement et la multiplicité des sources d'exposition. Ainsi, l'exposition aux phtalates a été associée à 40 jusqu'à 69% des problèmes de fertilité [24]. Par ailleurs, l'analyse des échantillons du sperme humain a révélé une corrélation positive entre les concentrations de métabolites de phtalates et la diminution du nombre de spermatozoïdes [40, 56, 128]. ZHANG et al.[126], ont rapporté que la concentration de phtalates dans le sperme des hommes a atteint un niveau de 0,08 à 1,32 mg/L, et serait lié à la baisse de la qualité du sperme et à l'infertilité. SWAN et al. [54, 129] se sont intéressés à la DAG (distance entre l'anus et l'appareil génital) et sa relation avec la fertilité. Ils ont constaté qu'une large population de jeunes hommes infertiles en Amérique présentaient une courte DAG considérée comme un indice qui reflète la qualité du sperme, plus elle est longue meilleure est la qualité du sperme, par contre une courte DAG annonce l'infertilité de l'homme. Les mêmes auteurs, ont également constaté que cette DAG est liée aux différentes malformations de l'appareil génital chez les jeunes enfants exposés aux phtalates. ces constatations leur ont permis de conclure que la DAG est un indice qui reflète l'exposition précoce aux phtalates et permet ainsi de prédire et d'anticiper les problèmes de fertilité à l'âge adulte.

3.2.8.2. Effets chez l'animal

Le DEHP a été reconnu, il y a longtemps, comme étant un perturbateur endocrinien et classé comme substance reprotoxique catégorie 1B, sur la base des études de reprotoxicité à fortes doses chez l'animal [17, 25, 42, 46, 52, 89].

Les différents effets d'exposition au DEHP observés sur le système reproducteurs mâle chez les animaux, ont fait l'objet de plusieurs "reviews" par les différentes communautés sanitaires, réglementaires et scientifiques [21, 25, 39, 89, 124, 127, 130-133]. Ci-dessous, un aperçu sur les principaux effets rapportés. L'objectif n'est pas de détailler les résultats de chaque auteur, mais de donner un aperçu globale sur les effets du DEHP sur l'appareil reproducteur mâle en fonction de la dose et de la période d'exposition.

3.2.8.2.1. Effets à fortes doses

3.2.8.2.1.1. Exposition post-natale

L'exposition post-natale couvre la période allant de sevrage à l'âge adulte, incluant ainsi la période pré-pubertaire, pubertaire et post-pubertaire. Comme nous l'avons précédemment signalé, la perturbation de développement du système reproducteur mâle pendant ces périodes critiques affecte les capacités reproductrices à l'âge adulte.

La quasi-totalité des études qui ont testés la reprotoxicité d'une exposition post-natale au DEHP chez les animaux (rat et souris) ont été conduites à fortes doses, de 100 à 8000 mg/kg. Globalement, les effets testiculaires observés se caractérisent par; une diminution du poids, des lésions histologiques traduites par l'hyperplasie des cellules de Leydig, l'atrophie des tubes séminifères, la dégénérescence de la lignée germinale particulièrement spermatocytes et spermatides, l'inhibition de la testostérone, la diminution de la concentration spermatique, ou carrément l'inhibition de la spermatogénèse avec une diminution de l'index de fertilité. [21, 23, 25, 100, 124, 134-140].

La suspicion de la molécule du DEHP pour ses effets reprotoxiques remontent aux années 70, avec les premières recherches, chez le rat, de l'équipe américaine SETH et ses collaborateurs qui ont rapporté des effets tératogènes du DEHP en 1972 [141], puis en 1974 [142]. La même équipe a rapporté un dysfonctionnement du système reproducteur incluant une baisse importante de l'indice de fertilité chez le rat adulte exposé à 6000, 10000, et 12000 mg/kg du DEHP, par injection unique en intrapéritonéale. Peu après, en 1976 [143], les auteurs rapportent des lésions testiculaires incluant une dégénérescence des tubes séminifères, après injection de 5ml/kg (équivalent de 4500mg environ) à des rats adultes . Plusieurs publications ont suivi pendant les années 80 [10, 70, 134, 137-140, 144-146]. Les auteurs ont rapporté un effet anti androgénique dose dépendant (inhibition de la testostérone) avec un dysfonctionnement grave du système reproducteur qui inclue; la diminution de poids des organes testicules et épидидymes, la dégénérescence des tubes séminifères (spermatogonie et spermatocytes), la baisse de la concentration spermatique de 50% environ, la baisse de l'indice de fertilité et l'augmentation du nombre de spermatozoïdes malformés, chez le rat adulte exposé à des doses allant de 300 jusqu'à 2000mg/kg pendant une période qui varie de 10, 15 et 60 jours en fonctions des études. A des niveaux de doses relativement faibles, 10 et 100mg/kg/jour du DEHP chez le rat, AKINGBEMI et al. [135] et GE et al. [147], ont rapporté des effets contradictoires à ceux observés à fortes doses (cités ci-dessus), principalement, une augmentation du nombre de cellules de Leydig de 40 à 60% (hyperplasie) accompagnée d'une stimulation de la production de la testostérone dont le niveau a augmenté

de 50% . En revanche, ZHAO et al.[148], ont rapporté récemment, en 2018, une diminution de la testostérone avec une diminution de la concentration spermatique et des poids des organes reproducteurs au même niveau de dose 100 mg/kg, chez les souris adulte traitées pendant 4 semaines. ERKEKOGLU et KOCER-GUMUSEL [21] et MUCZYNSKI [5], ont indiqué que les cellules de Leydig et Sertoli sont les premières cibles du DEHP et que plusieurs auteurs ont observé leur dysfonctionnement. ZHU et al.[149], ont rapporté une action apoptotique du DEHP sur les cellules de Leydig.

3.2.8.2.1.2.Exposition *in utero* (fœtale)

Tout comme l'exposition post-natale, la plupart des études d'exposition au DEHP *in utero* ont été conduites à fortes doses, allant de 10 à 1000mg/kgPC/jour et les effets ont été mesurés chez la descendance mâle au sevrage comme à l'âge adulte. Plusieurs effets tels que; la cryptorchidie, l'hypospadias, l'atrophie des organes reproducteurs (testicule, épидидyme), un effet anti androgénique (inhibition de la testostérone), une diminution de la concentration spermatique, une puberté retardée, une diminution de la DAG (féminisation des mâles), une diminution de l'indice de fertilité, une malformation de l'épididyme, une dégénérescence des tubes séminifères et la perturbation de la prolifération des cellules de Leydig et Sertoli, ont été observés chez le rat exposé *in utero* [21, 25, 46, 124, 127, 130-133, 150-153]. GRAY et al. [154], ont rapporté une altération de la différenciation sexuelle et malformations de l'appareil reproducteur à une dose de 750mg. Par ailleurs, une diminution de; diamètre et du nombre des tubes séminifères, taille de la lignée germinale, concentration spermatique, densité du sperme, DAG et testostérone ont été également rapportés à 100 et 500mg/kg [155, 156] . Dernièrement, en 2018, HU et al.[157], ont rapporté une augmentation du nombre de cellules de Leydig, par conséquence stimulation de la synthèse de la testostérone, à 100mg/kg, par contre à 1000mg/kg l'hormone a été inhibée. Selon certains auteurs, ces différents effets regroupés sous le nom "syndrome phtalate" sont similaires au syndrome TDS observé chez l'homme [54, 127].

3.2.8.2.1.3.Exposition trans-générationnelle

Les études trans-générationnelles de toxicité du DEHP pour le système reproducteur sont très rares et toutes ont été conduites à forte doses et en se focalisant sur l'exposition *in utero/lactation*. Il s'est avéré que la plupart des effets observés chez la première génération F1 après l'exposition *in utero*, ont été transmis aux générations suivantes. Une dose de 750mg/kgPC/jour du DEHP a donné une forte incidence de cryptorchidie avec diminution de la DAG chez les générations F1 et F2, diminution de la concentration spermatique a été

observé uniquement à la génération F1, et la diminution du poids des organes testicules et épидидymes observée sur 4 génération F1, F1, F3 et F4, chez le rat [158] . Suivant la même approche , DOYLE et al.[159], ont rapporté une baisse de la concentration spermatique et des lésions histologiques des tubes séminifères sur 4 générations F1, F2, F3 et F4, puberté retardée chez F1, F2 et F3 et diminution de la DAG, uniquement chez la première génération F1, à 500 mg/kg/jour, chez la souris. Enfin, GRAY et al.[160], ont rapporté une diminution de DAG, concentration spermatique et du poids des organes reproducteurs uniquement à la première génération F1 à 300mg/kg/j, chez le rat.

3.2.8.2.1.4. Exposition paternelle

Deux études ont testé l'effet d'une exposition paternelle sur la reproduction de la descendance [136, 161]. Les auteurs, ont indiqué que l'exposition paternelle peut affecter le génome mâle qui transmettrait les effets à la descendance. Dans leurs études, ils ont exposé la génération paternelle F0 (les mâles) à 2000 et 8000 mg/kg/j pendant 8 semaines (à partir de 38^{ème} JPN) avant l'accouplement et ils ont observé une diminution de la qualité du sperme de la descendance mâle à l'âge adulte.

3.2.8.2.2.Effets à faibles doses

Malgré le nombre considérable de publications suggérant l'effet des perturbateurs endocriniens à faibles doses, il n'y a pas eu beaucoup d'études sur DEHP, et le peu qui existe jusqu'à présent se sont focalisées, pour la majorité, sur l'exposition *in utero*. Les effets rapportés sont controversés et non monotoniques.

3.2.8.2.2.1. Exposition *in utero*

ANDRADE et al.[150, 151], ont testé les effets à faibles doses de 15, 45, 135, 405, 1215 et 5000µg/kg chez le rat au sevrage ainsi qu'à l'âge adulte exposé *in utero*/lactation. Aucun effet n'a été rapporté chez le rat au sevrage (22 JPN), à l'exception d'une augmentation de DAG à 15µg/kg. La testostérone, l'histopathologie des testicules et la puberté n'ont montré aucun changement. Par contre, chez le rat adulte les auteurs ont noté une faible incidence de cryptorchidie à 5mg/kg et une diminution significative de la production journalière du sperme à 45 et 1215µg/kg, alors que la fertilité n'a été affectée à aucun niveau de doses. Concernant la testostérone les auteurs, ont rapporté une réponse non monotonique, ils ont noté une augmentation significative à 45 et 405µg/kg, tandis qu'à 5mg/kg l'hormone n'a pas été affectée. De même, CHRISTIANSEN et al. [152], n'ont observé aucun effet à 3mg/kg chez la souris immature (au 16^{ème} JPN) exposée *in utero*/lactation (la DAG n'a pas été affectée et la

testostérone n'a pas été évaluée). En revanche, DO et al.[162] ont rapporté une stimulation des fonctions reproductrices avec des réponses non monotoniques à 0.5, 1, 5, 500 et 50000 μ g/kg. Les auteurs ont noté l'augmentation de niveau la testostérone, de la DAG et des poids des testicules chez le fœtus de souris exposé pendant la gestation. Dans leurs études, POCAR et al.[163] et FIANDANESE et al.[164] ont testé les doses 50 μ g/kg et 5mg/kg, considérées comme DJT et NOEAL respectivement, chez la souris adulte exposée *in utero*. Les auteurs ont presque tous rapporté les mêmes effets observés à fortes doses, à savoir; la diminution du poids des organes reproducteurs, la diminution de la testostérone, la diminution de la production journalière du sperme de 30% et la diminution de la concentration spermatique de 50 à 70% avec une viabilité des spermatozoïdes de 20%. D'autres effets ont été signalés récemment, une diminution de la différenciation des cellules de Sertoli 0.02, 0.2, 2mg chez la souris au sevrage [165] et une malformation de l'épididyme à 5 et 50 μ g/kg chez le rat [166].

3.2.8.2.2.2. Exposition post-natale

Concernant les effets à faibles doses pendant la période post-natale, les deux études qui existent jusqu'à présent ont été conduites par: ZHANG et al.[167] à 5, 20 et 40 μ g/kgPC/jour pendant la période néonatale de 7 au 49JPN, par injections intrapéritonéales chez la souris, les auteurs ont rapporté une diminution de la concentration spermatique et des lésions histopathologiques des testicules. HSU et al. [168] à 100, 300, et 1000 μ g/ kg/d du DEHP pendant la période de l'adolescence ,de 42 au 105 JPN. Les auteurs ont rapporté une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes malformés sans être accompagnée d'une baisse significative de la concentration spermatique.

3.2.8.2.2.3. Exposition trans-générationnelle et paternelle

D'après ma recherche bibliographique, notre travail de cette présente thèse semble être le premier à étudier ces deux types d'expositions à faibles doses.

CHAPITRE 4

DETERMINATION ANALYTIQUE DU DEHP

Comme nous l'avons précédemment cité, le DEHP est un perturbateur endocrinien qui suscite beaucoup d'inquiétude en raison de son omniprésence dans l'environnement, la multiplicité des sources et voies d'exposition et ses effets toxiques particulièrement sur le système reproducteur mâle. Par conséquent, son dosage dans les différentes matrices environnementales s'impose comme une exigence primordiale et problématique de santé publique de premier ordre.

La méthode analytique de référence définie par ISO (norme 18856) est la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), qui permet de faibles limites de détection, de l'ordre de nano-gramme. Néanmoins, elle est très fastidieuse, onéreuse et inaccessible. Pour cela, la mise en place de méthodes analytiques alternatives de routine, performantes, rapides, reproductibles, sensibles, accessibles et moins coûteuses, pour pouvoir détecter les traces du DEHP, demeure actuellement l'un des défis majeurs des scientifiques qui sont confrontés à plusieurs difficultés.

4.1. Difficultés analytiques: problématique du "blanc" analytique

L'une des difficultés majeures de l'analyse du DEHP réside dans le risque important des contaminations secondaires ou croisées durant toute la procédure analytique (prélèvement, extraction, purification, analyse), en raison de son omniprésence dans l'environnement, spécialement dans l'air du laboratoire et ses différents matériel; verreries, solvants organiques, filtres, cartouches d'extraction,... [105, 169, 170]. En effet, des concentrations de 0.9 à 3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ du DEHP ont été rapportées dans l'air du laboratoire [95], et 0.59, 0.58, 6.39, 0.28 ng/ml, rapportées dans l'hexane, acétone, dichloromethane et acetonitrile, respectivement [170]. Il a été détecté même dans l'eau ultra pure du laboratoire [171] ce qui fait que c'est impossible d'avoir des blancs analytiques corrects dans la limite fixée par la norme ISO 18856 qui est de 80ng/L. les concentrations du DEHP observées dans les blancs, rapportées dans la littérature, varient entre 90 à 1640 ng/l avec une moyenne de 500ng/L [169], comme indiqué sur la figure 4.1, les sources de contamination sont présentées dans la tableau 4.1.

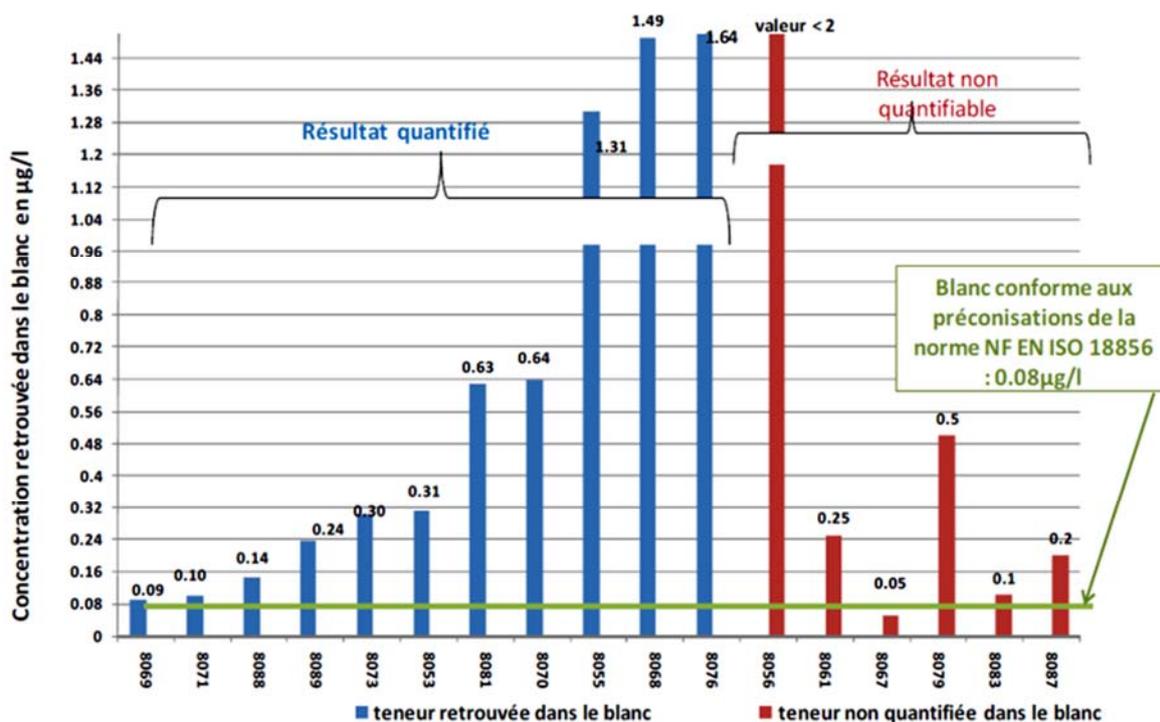


Figure 4.1: Concentrations du DEHP observées dans les blancs (INERIS [172]).

Tableau 4.1: Sources et valeurs de contamination en DEHP [95, 172]

Source de contamination en DEHP	Teneur moyenne en DEHP introduite exprimée en ng/l d'eau	Multiple de la valeur maximale du blanc fixée par la norme ISO
Prélèvements	12000	150
Flacons	560	7
Cartouches SPE en verre	760	9
Cartouche SPE en plastique	710	9
Gants latex	1600	20
Gants nitrile	320	4
Solvants	210	3
Air du laboratoire	3000 ng/m ³	37

Bien qu'il paraît impossible d'éliminer complètement les contaminations croisés et que jusqu'a présent aucune stratégie analytique n'est validée pour régler le problème , une préparation préalable de l'environnement du laboratoire s'impose pour réduire les niveaux de contamination, en appliquant les instructions suivantes (selon GUO et al. [170] et MORET et al. [105] :

- Eliminer les matériaux plastique du laboratoire
- Eviter l'utilisation des agents nettoyants au cours de l'analyse
- Eviter l'utilisation des gants en plastique
- Bien nettoyer la verrerie avec le lave vaisselle, la rincer avec de l'eau ultra pure et l'acétone puis la sécher à l'étuve pendant 2h ou toute la nuit à 400°C.
- Bien nettoyer les paillasses du laboratoire avec de l'eau chaude et rincer avec de l'acétone.
- Choisir des solvants purs de grade analytique
- Minimiser au maximum les étapes de prétraitement des échantillons, leur temps de préparation et leur contact libre avec l'air du laboratoire
- Faire des essais à blanc au cours de toutes les étapes de l'analyse

4.2. Techniques de préconcentration des phtalates (DEHP)

La présence du DEHP en traces, particulièrement dans l'eau, en raison de sa faible solubilité (0.27 mg/L à 25 °C [89]), est une autre difficulté analytique qui exige de développer des techniques d'extractions et de préconcentration préalables à son dosage pour qu'il soit détectable par l'instrument analytique.

Différentes techniques de préconcentration pour les phtalates ont été développées, mais les plus fréquemment utilisés sont: L'extraction liquide - liquide (LLE) qui est un procédé qui permet la séparation des constituants d'un mélange en mettant à profit leur distribution inégale entre deux liquides pratiquement non miscibles [106, 170, 173-175]. Néanmoins cette technique a l'inconvénient d'être fastidieuse, très laborieuse avec utilisation de beaucoup de verrerie et de grandes quantités de solvants, favorisant ainsi les contaminations. En effet, de 10 à 100 ng du DEHP peuvent être introduite dans la procédure analytique uniquement pas les solvants [105, 170, 174, 176]. Raisons pour lesquelles cette technique a été écartée dans notre travail. L'extraction sur phase solide (SPE) utilisée comme méthode de référence et la lyophilisation comme méthode alternative, sont également des techniques de préconcentration utilisées par plusieurs laboratoires pour l'analyse du DEHP dans l'eau minérale en bouteille de PET [93, 106]. Ces deux techniques ont été retenues dans notre travail en raison de faibles quantités de solvants impliqués par conséquence minimiser les contaminations pendant le prétraitement.

4.2.1. Extraction sur phase solide (SPE)

4.2.1.1.Principe

La SPE est une méthode de référence et actuellement la technique la plus couramment utilisée pour la préconcentration des phtalates dans l'eau. Elle est basée sur la distribution des composés entre la phase liquide (échantillon) et la phase solide, adsorbant qui est généralement conditionné dans une cartouche en verre ou en plastique et inséré entre deux frittés. C'est un processus apparenté à celui de la chromatographie liquide qui utiliserait l'adsorbant comme phase stationnaire : si le soluté présente une forte affinité vis-à-vis de l'adsorbant, il y reste totalement fixé au cours de la percolation de l'échantillon aqueux. Le soluté est ensuite désorbé par un petit volume de solvant éluant [106, 170, 173-175, 177].

On distingue trois modes de rétention des composés par l'adsorbant : interactions hydrophiles, interactions hydrophobes ou par échange d'ions. Pour l'analyse de l'eau, l'extraction est généralement réalisée en phase inverse sur des supports hydrophobes, qui se base sur la distribution des composés de la phase liquide polaire avec un adsorbant apolaire [173, 174]. Par conséquent, la sélectivité de l'adsorbant est une importance capitale pour le rendement de l'extraction [174]. Plusieurs adsorbants pour la SPE en phase inverse sont développés et commercialisés pour l'extraction des phtalates, les plus utilisés sont les adsorbants de silice C18, qui considéré comme adsorbant universel pour l'extraction SPE, et l'adsorbant " hydrophilic lipophilic balanced" (HLB) [178]. En raison de leur capacité de rétention des analytes apolaires ainsi que ceux ayant une polarité modérée [174, 177, 178]. Les interactions mise en jeu ont lieu entre les liaisons C-H des groupements fonctionnels de l'adsorbant et les liaisons C-H des analytes. Ces interactions sont dues aux forces d'attraction de basse énergie de type van der Waals, de dispersion ou de partition. L'utilisation d'un solvant non polaire permet la rupture des interactions avec l'adsorbant et donc l'élution des composés [178].

4.2.1.2. Etapes de la SPE

La SPE comporte généralement 4 étapes (Figure 4.2.A). Selon PICHOU [177] et ALVAREZ [178]

- Le conditionnement de l'adsorbant avec le solvant d'élution;
- Rinçage avec d'eau ultra pure ou avec du méthanol;
- Raccorder les cartouches à un dispositif à vide pour l'extraction en phase solide (Figure 4.2.B)
- Percolation de l'échantillon à travers l'adsorbant;

- Séchage de l'adsorbant en le raccordant à un dispositif de séchage sous un flux d'azote (Figure 4.2.C);
- Elution des analytes avec un volume adéquat de solvant adapté pour rompre les interactions entre les solutés et l'adsorbant.
- Evaporation sous flux d'azote
- Reconstitution dans un solvant adéquat

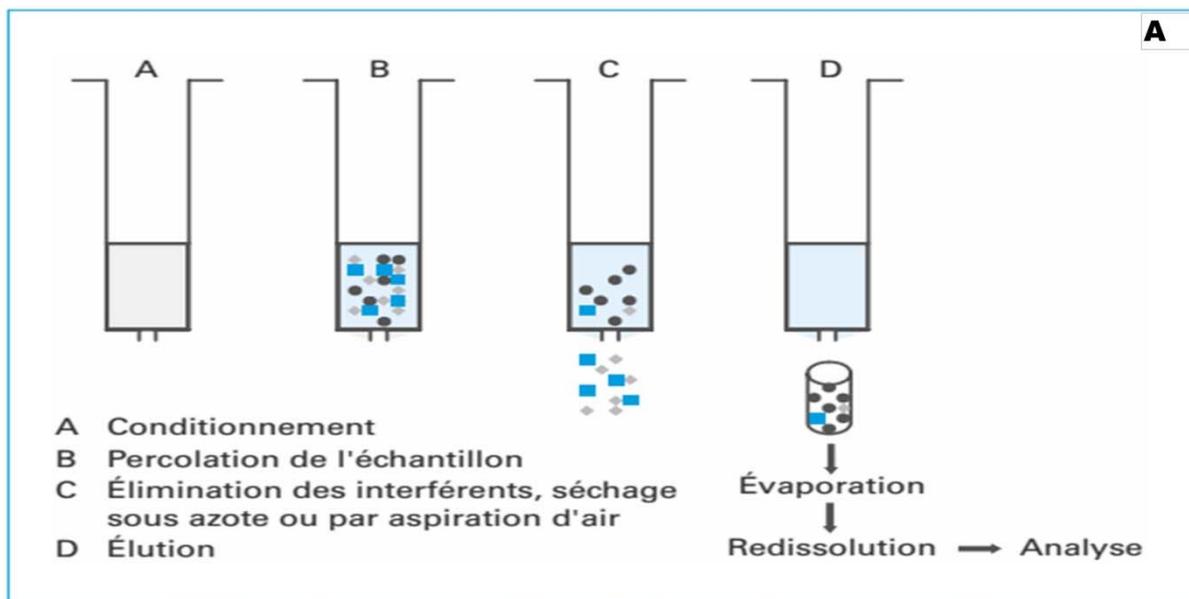


Figure 4.2: Processus d'extraction SPE, A: Etapes de l'extraction [177]; B et C: Dispositifs à vide et dispositif d'évaporation sous flux d'azote, respectivement, de centre de bioéquivalence de Saidal, Alger.

4.2.2. Lyophilisation

La lyophilisation, est une technique universelle de préconcentration à basse température qui consiste à éliminer par sublimation, la majeure partie de l'eau contenue dans un produit [179]. Elle a été utilisée par plusieurs auteurs pour la préconcentration des contaminants organiques en traces dans l'eau. BISCARDI et al., [93] l'ont utilisé pour préconcentrer le DEHP dans l'eau minérale en bouteille. Dans le rapport de "*Institut des matériaux et mesures de référence*" du "*Centre commun de recherche*" de la "*Commission Européenne*" , concernant les méthodes analytiques appliquées à la détermination des phtalates dans les aliments, THOMAS WENZEL [106] a indiqué que la lyophilisation est l'une des techniques utilisées par certains laboratoires pour la préconcentration des phtalates.

4.3. Les techniques d'analyse

Comparativement aux difficultés de la procédure de prétraitement et la problématique du blanc en raison des contaminations environnementales, l'analyse des échantillons préconcentrés par les différentes techniques d'analyses est relativement simple [173].

Les phtalates sont des substances semi volatiles, stables et non polaires, elles peuvent être analysés par plusieurs méthodes, les plus utilisées sont les méthodes chromatographiques; la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et chromatographie en phase gazeuse (CPG), couplées à plusieurs types de détecteurs, allant des plus simples; Détecteur ultraviolet (UV), diode array detection (DAD), détecteur d'ionisation de flemme (FID), détecteur de capture d'électron (ECD), au plus performant, spectrométrie de masse (SM) [173, 174, 181].

Dans notre travail nous avons opté pour l'HPLC-UV en raison de sa simplicité et de sa disponibilité dans la plupart des laboratoires.

4.3.1. HPLC-UV

l'HPLC-UV a été utilisée par plusieurs auteurs pour le dosage du DEHP dans l'eau, des limites de détection de l'ordre de nano-gramme (ng) au micro-gramme (μg) ont été reportées (Tableau 4.2) . L'application de cette méthode pour le dosage des phtalates a connu une hausse remarquable à partir de 2007 lorsque elle a été utilisée pour détecter et quantifier le DEHP dans l'eau avec des limites de détection entre 1.0 et 3.8 ng/ml [182] . Selon MORET et al. [105], la limite de détection dépend de l'étape de prétraitement, des conditions expérimentale et de la matrice de l'échantillon. Pour les matrices simples comme l'eau, de très faibles limites de détection peuvent être atteindre, de l'ordre de 0.005 et 0.01 $\mu\text{g}/\text{l}$, en raison de la simplicité de la procédure d'extraction, utilisation de faibles quantités de solvants et de la

verrierie. Un récapitulatif des articles qui ont utilisés HPLC UV pour le dosage du DEHP dans l'eau avec les différentes conditions opératoires et les limites de détections est présenté dans le tableau 4.2. La plus faible limite de détection du DEHP dans l'eau minérale par HPLC-UV a été rapportée en 2012 par WU et ses collaborateurs [183], (Tableau 4.2).

Tableau 4.2: Récapitulatif des conditions opératoires et résultats de dosage du DEHP dans l'eau minérale embouteillée en PET par HPLC-UV et CPG

Méthodes	Préconcentration	LOD (µg/l)	Linéarité (µg/l)	DEHP (µg/l)	Références
HPLC-UV	SPME	0.6	10-110	9-22	[171]
	LPME	0.2-1.2	1-300	4-47	[184]
	LLE	0.14	0.5-10 mg/l	1.14-5.43	[185]
	/	0.04	0.1-50	ND<0.04	[183]
	/	1.0–3.8	10–200	ND	[182]
	SPE	0.1	0.1–10 mg/l	/	[186]
GC-MS	Lyophilisation	/	/	3.21mg/L	[93]
	LLE	0.002-0.03	0.01-0.2	0.35	[187]
	LLE	0.02	/	<0.02-0.2	[188]
	SPE	2-12	/	<0.002-0.188	[94]
	SPME	0.003-0.08	/	0.052-0.093	[189]
	SPME	0.01-0.08	/	0.02	[96]
	SPME	0.125	0.125- 0.5	<0.125	[190]
	SPME	0.103	/	<0.103	[191]
	LLE	0.30	1.2–150.0	0.170	[192]
	LLE	0.02	0.3-1.2	1.14-5.43	[185]
	SPE	/	/	1.7	[193]
	SPE	0.006	0.02 -10	1-2.5	[175]
	SPE	/	/	0.4	[97]
	SPME			ND	[194]
SPE				[195]	
GC/ECD	LLE	0.04	/	8-50	[196]
	LLE	5ng/L		0.046-0.145	[98]

4.3.1.1.Principe de l'HPLC [197]

La chromatographie en phase liquide est une méthode séparative utilisée pour des analyses qualitatives et quantitatives. Elle permet la séparation des constituants chimiques de mélanges complexes. Les séparations sont fondées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles:

- Phase stationnaire: silice vierge greffée directement sur la paroi interne de la colonne qui retient les solutés;
- Phase mobile: constituée par un solvant pur par un mélange de solvants), qui entraîne les solutés au travers de la phase stationnaire.

Chaque soluté injecté sur la colonne est soumis à deux effets antagonistes : un effet d'entraînement par la phase mobile dans laquelle il est soluble et un effet de rétention par la phase stationnaire avec laquelle il interagit . En fonction de l'affinité de chacun des solutés vis-à-vis des phases mobiles et stationnaires, chaque soluté aura une vitesse de migration différente lors de son passage au travers de la colonne. De ce fait, les solutés du mélange sont donc progressivement séparés. On distingue deux types de chromatographie liquide en fonction des polarités des phases mobile et stationnaire qui sont déterminantes pour obtenir une bonne séparation des solutés:

- Chromatographie en phase normale: La phase stationnaire est polaire et la phase mobile est non polaire, les solutés sont séparés dans l'ordre de leur polarité croissante.

- Chromatographie en phase inverse (utilisée pour la séparation des phtalates): La phase stationnaire est non polaire (généralement colonne C18 en phase inverse) et la phase mobile est polaire, les solutés polaires sont entraînés rapidement par la phase mobile polaire tandis que les solutés peu polaires seront retenus par la phase stationnaire non polaire.

Les deux modes d'élution; isocratique (la phase mobile est maintenue constante durant toute l'analyse) et gradient (la phase mobile est modifiée progressivement, sont utilisés pour l'analyse du DEHP [171, 183-185].

4.3.1.2. Détecteur- UV

Le détecteur UV est le plus utilisé pour l'HPLC en raison de la simplicité de son utilisation, faible coût, son application aux composés qui ont un chromophore UV et sa capacité d'arriver à des limites de détection de l'ordre de "ng" pour le DEHP [105, 198].

CHAPITRE 5

MATERIEL ET METHODES

5.1. Matériel

5.1.1. Matériel chimique (réactifs et solvants)

Tous les solvants et réactifs utilisés sont de grade analytique et/ou HPLC, filtrés sur filtre de 0.2 µm et conditionnés sous l'azote, l'eau ultra-pure (type1) de grade HPLC obtenue avec un appareil « Direct-Q UV" de millipore, filtrée sur 0,22µm "millipak express".

Le tableau 5.1 présente la provenance et usage des solvants et réactifs utilisés tout au long de la réalisation des travaux de cette présente thèse.

5.1.2. Matériel biologique

- Rats Wistar, mâles et femelles , provenant de l'élevage de LNCPP, service pharmacotoxicologie.

Tableau 5.1: Provenance des solvants et réactifs utilisés

Solvants/réactifs	Marque	Provenance	Usage
Etude toxicologique			
DEHP	LG chemical	Hamtech	Etude de toxicité
Ethanol absolu	Sigma	LNCPP	Etude histopathologique
Xylène	Sigma	LNCPP	
Formol	Sigma	LNCPP	
Paraffine	Sigma	LNCPP	
Hématoxyline		CHU Benimessous	
Eosine		CHU Benimessous	
BSA	Sigma	LNCPP	
PBS	/	LNCPP	
Etude analytique			
Méthanol	VWR chemicals	Wanylab	Solvant
Acétonitrile	CARLO ERBA	Wanylab	Phase mobile
Acétone	Biochem	Wanylab	Rinçage
Substances de référence: DEHP, DIBP, DBP	Sigma	Wanylab	Validation analytique

5.1.3. Appareillage

Le tableau suivant présente la totalité de l'appareillage utilisé tout au long de la réalisation des travaux de cette présente thèse.

Tableau 5.2: Appareillage employé

Appareillage	Marque	Provenance/laboratoire	Usage
Etude toxicologique			
Microscope inversé	Hund Wetzlar	LNCPP	Spermogramme
Etuve	Mammert	LNCPP	
Agitateur vortex	Technica	LNCPP	
Microscope optique avec caméra	LEICA DM LS2 Microsystems	Service anapath CHU Benimessous	Eude histologique
Microtome	Leica		
Balance	Kern	LNCPP	Pesée de la substance testée et des organes
Balance de précision	Shimadzu	LNCPP	
Centrifugeuse réfrigérée	Sigma	LNCPP	Centrifugation du sang
Congélateur	Liebherr	LNCPP	Congélation des sérums
Cobas 6000	Hitachi "Roche"	Laboratoire Boukhtouche	Dosage hormonal
Etude analytique			
HPLC-UV	Thermo /Waters	Wanylab/LNCPP	Dosage du DEHP
Balance de précision	Sartorius	Wanylab	Pesée du DEHP
Lyophilisateur à ballons	Bioblock	CRNA	Préconcentration du DEHP
Lyophilisateur simple	Finn-Aqua	CRNA	
Dispositif d'extraction sous vide SPE	Waters	Centre de bioéquivalence de Saidal	
Dispositif de séchage sous flux d'azote	Liebisch	Centre de bioéquivalence de Saidal	Séchage de l'éluât
Agitateur vortex	Tchtnica	LNCPP	Reconstitution de l'éluât et de lyophilisat
Agitateur incubateur	Heidolph	LNCPP	
Four à moufle	NÜVE furnace MF106	Wanylab	Prétraitement de la verrerie

5.2. Méthodologie expérimentale

5.2.1. Etude trans-générationnelle de reprotoxicité à faibles doses du DEHP chez le rat

5.2.1.1. Conditions d'encagement et préparation des animaux

"L'éthique de l'expérimentation animale est fondée sur le devoir qu'a l'Homme de respecter les animaux en tant qu'êtres vivants et sensibles, dotés de capacités cognitives et émotionnelles. Ainsi, tout recours à des animaux en vue d'une expérimentation scientifique engage la responsabilité morale de l'expérimentateur vis-à-vis des animaux utilisés". Par conséquent, nos animaux (rats) sont traités avec soins et respect durant toute la période de l'expérimentation, dans de bonnes conditions d'élevage et en mettant en œuvre les techniques de contention les moins stressantes (en fonction de l'état physiologique de l'animale), ainsi que les techniques d'euthanasie les moins douloureuses.

L'étude a été réalisée au niveau de service pharmaco-toxicologie de LNCPP, au total 96 mâles et 96 femelles âgés de 21 jours (au sevrage), qui constituent la génération parentale F0 (paternelle et maternelle), sont divisés au hasard en quatre (4) groupes de 24 rats/sexe/groupe, un groupe témoin (reçoit uniquement le véhicule) et 3 groupes traités. Les rats (mâles et femelles) sont identifiés individuellement avec un tatouage unique sur l'oreille et également encagés individuellement dans des cages transparentes en polycarbonate de type E, dans une animalerie maintenue à une température de $21 \pm 5^\circ\text{C}$, une hygrométrie stable de $53 \pm 7\%$ avec un photocycle de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Les rats ont eu accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau fournie dans des biberons en verre.

Toute utilisation du plastique est éliminée (excepté les cages en polycarbonates présumées exemptes de phtalates) et les animaux sont traités dans les mêmes conditions (même expérimentateur et même endroit) durant toute la période de l'expérimentation, pour éviter d'éventuelles interférences ou contaminations.

5.2.1.2. Dosage

Trois niveaux de doses du DEHP (LG CHEMICAL, CAS N° 117-81-7, pureté 99.8 %) ont été testés:

- 0.5µg/kgPC/j, considérée comme la plus faible dose d'exposition humaine, selon VANDENBERG et al. [64]
- 50µg/kgPC/j, considérée comme une dose journalière tolérable (DJT) (EFSA 2005)
- 5000 µg/kgPC/j, considérée comme dose sans effets chez le rat (NOAEL) [199];
- Le groupe témoin ne reçoit que le véhicule ;

5.2.1.3. Conception de l'expérimentation (protocole expérimentale)

Nous avons mené une étude trans-générationnelle de toxicité pour la reproduction selon le protocole alternatif de reprotoxicité qui combine l'exposition paternelle et maternelle, développé par ANDERSON et al. [200, 201], et en appliquant les différentes recommandations de l'OCDE (416/2001 et 443/2012) relatives aux procédures de préparations et traitement des animaux dans les études étendues de toxicité pour la reproduction.

Ainsi, la génération paternelle (les mâles) F0 (un groupe témoin et 3 groupe traités) a été exposée au DEHP (0, 0.5, 50 et 5000 μ g/kgPC/j) par un gavage quotidien (figure 5.1), de sevrage jusqu'à l'âge adulte (21^{ème} JPN au 105^{ème} JPN), avant l'accouplement (couvrant au moins un cycle complet de spermatogénèse) et pendant les deux semaines (15 jours) de l'accouplement. Tandis que la génération maternelle F0 (les femelles) a été exposée au DEHP (les mêmes doses que les mâles) deux (2) semaines avant l'accouplement (couvrant au moins 4 cycles œstraux) et continue à recevoir le DEHP tout au long de la gestation et la lactation jusqu'au sevrage de leur descendance F1 au 21^{ème} JPN.

Au sevrage de la descendance qui constitue la génération F1, exposée au DEHP via la voie placentaire pendant la gestation et via le lait maternel pendant la lactation, ainsi que via l'exposition de son génome paternel, les ratons, mâles et femelles (de la génération F1) ont été divisés en deux groupes, en prenant en considération les liens de fraternité entre eux, afin de ne pas accoupler les membres d'une même fratrie: le groupe F1a est sacrifié au sevrage pour l'évaluation de la toxicité du DEHP pour le système reproductif immature et le groupe F1b destiné à la production de la génération F2 sans l'exposition au DEHP (l'exposition s'arrête au sevrage de la F1). Les deux générations parentales paternelles F0 et F1 sont sacrifiées à la fin de chaque accouplement pour l'évaluation de toxicité du DEHP pour le système reproductif adulte. Tandis que les deux générations parentales maternelles F0 et F1 sont sacrifiées à la fin de la période de lactation de leur descendance. La figure 5.2 illustre toute la conception de l'expérimentation.

5.2.1.4. Procédure d'accouplement des générations parentales F0 et F1

Au 105^{ème} JPN, les femelles F0, exposées au DEHP pendant deux semaines, ont été introduites dans les cages des mâles F0, exposés au DEHP à partir de sevrage, (accouplement 1:1) pendant deux semaines. Les femelles sont examinées tous les matins pour présence d'un bouchon vaginal ou de spermatozoïdes dans un frottis vaginal. Le jour 0 de la gestation est défini comme étant celui où l'on observe de spermatozoïdes ou un bouchon vaginal. Les

couples (mâles et femelles) qui n'ont pas engendré de descendance ont subi un deuxième accouplement avec un reproducteur ou une reproductrice ayant fait ses preuves, afin de confirmer ou éliminer l'infertilité du mâle ou de la femelle.

5.2.1.5. Observations cliniques et pesée des animaux

Tous les rats font l'objet d'une observation clinique quotidienne, avant et après le gavage, pour détecter d'éventuels signes de toxicité, changement de comportement et mortalité, tout animal souffrant est éliminé de l'étude et euthanasié/autopsié. Les rats mâles et les femelles non gravides sont pesés deux fois par semaine, tandis que les femelles gravides sont pesées trois fois par semaine. Pendant la lactation, les femelles ainsi que leur descendance sont pesés au 1, 7, 14 et 21^{ème} JPN. La taille des portées et le sexe des ratons sont déterminés au premier jour de la naissance (1JPN).

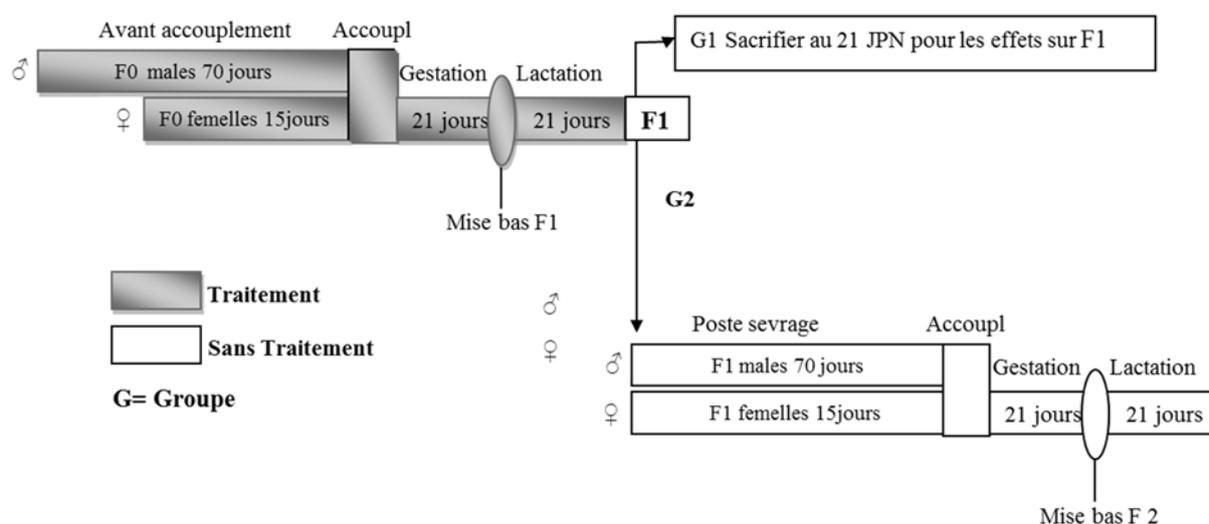


Figure 5.2: Conception de l'expérimentation animale

5.2.1.6. Paramètres reproductifs évalués

5.2.1.6.1. Générations paternelles adultes F0 et F1 (système reproductif adulte)

5.2.1.6.1.1. Indices de reproduction

Les différents indices suivants sont calculés selon les formules rapportées par PARKER [2] :

- Indice de fertilité (%): (nombre de mâles fécondant une femelle / nombre de mâles accouplés)* 100;
- Indice de gestation: (nombre de femelles avec des ratons vivants / nombre de femelles gestantes)*100;
- Taille de portée: nombre total des ratons nés par femelle;
- Sexe ratio (%): nombre de mâles/nombre de femelles;
- % de ratons mâles: (nombre de mâles/ la taille de portée)*100;
- Indice de survie à la naissance: (nombre total de ratons nés vivants / nombre total de ratons nés)* 100;
- Indice de survie et au 21^{ème}JPN: (nombre total de ratons vivants au 21^{ème} JPN/ nombre total de ratons nés)* 100.

5.2.1.6.1.2. Poids corporel et organes reproducteurs

A la fin de chaque accouplement, au 120^{ème} JPN, tous les mâles sont pesés puis sacrifiés par décapitation . Le sang de la plaie est récupéré dans des tubes secs, placé à froid. Les testicules et les épидидymes sont prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux puis pesés. Le testicule et épидидyme droits sont fixés immédiatement dans du formol 10% pendant 24H pour l'examen histologique. La queue de l'épididyme gauche est également pesée et placée immédiatement dans des boîtes de Pétri en verre contenant 10ml de diluant ; albumine de sérum bovin / tampon phosphate salin (BSA/PBS) (1% BSA), pré-incubé à 34°C pour l'évaluation des paramètres spermatiques .

5.2.1.6.1.3. Paramètres spermatiques (concentration et motilité)

La concentration spermatique et la motilité ont été évaluées selon le protocole rapporté par PARKER [2]. Immédiatement après l'euthanasie, la queue de l'épididyme gauche est pesée puis placée dans des boîtes de Pétri en verre contenant 10ml de diluant BSA/PBS (1% BSA) pré-incubé à 34°C, percée 3 ou 4 fois par une lame de bistouri puis incubée à 34 °C pendant 5 à 8mn pour permettre la diffusion du sperme, après une légère agitation rotative (Figure 5.3).

Pour l'évaluation de la motilité, 10 μ l de l'aliquote sont placées dans la chambre de la cellule de Malassez et analysées sous un microscope inversé (HundWetzlar), objectif 40. Au moins 200 spermatozoïdes sont comptés par animal et classés mobiles ou immobiles. La motilité est exprimée en ratio (%) de spermatozoïdes mobiles par rapport au nombre total de spermatozoïdes comptés.

Tandis que pour l'évaluation de la concentration spermatique, l'aliquote obtenu est dilué à un dixième (1:10) avec le PBS à 1% du formol. Après une agitation pendant quelques secondes au vortex, une goutte de la suspension est prélevée et placée dans la chambre de la cellule de *Malassez* pour le comptage. La concentration spermatique est rapportée en nombre de spermatozoïdes par (g) du poids relatif de la queue épидидymaire.

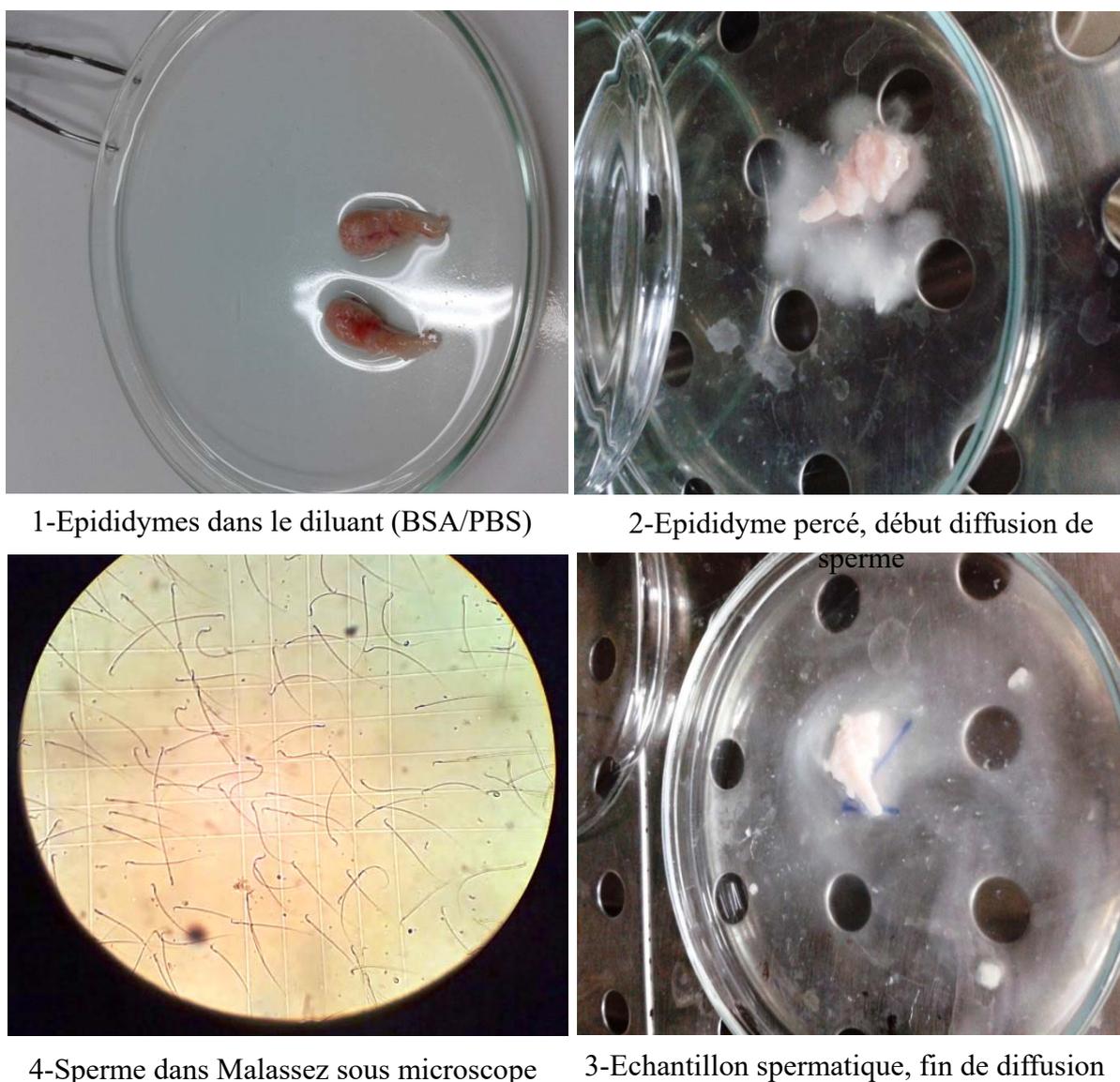


Figure 5.3: Différentes étapes d'évaluation des paramètres spermatiques

5.2.1.6.1.4. Examen histopathologique des testicules et épидидymes

Le protocole classique de l'histologie a été appliqué. La déshydratation s'est fait par bains successifs de 1h et 30 min d'éthanol (70, 90, 100%) puis l'éclaircissement par deux bains successifs également de 1h et 30 mn de toluène. Les pièces (testicules et épидидymes) sont ensuite mises dans de la paraffine liquide (60°C) pendant au moins 4h puis incluses dans des blocs de paraffine. Les blocs sont coupés au microtome avec une épaisseur de coupe de 3microns.

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, la technique à l'hématoxyline-éosine (HE) a été effectuée. Les lames sont plongées dans l'Hématoxyline (colorant nucléaire bleu) pendant 5mn, 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 et lues sous microscope optique (LEICA DM LS2 Microsystems).

L'analyse est principalement focalisée sur l'étude qualitative des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères ainsi que dans la queue de l'épididyme. Dans le testicule trois (3) champs sélectionnés au hasard, comportant environ six (6) tubes séminifères, sont examinés par animal et par un niveau de coupe (n=10/groupe), ce qui donne un total de 360 tubes examinés par groupe. De la même manière, trois (3) champs sélectionnés au hasard dans la région proximale de la queue de l'épididyme par chaque animale (n=10/groupe) et par un niveau de coupe, ce qui donne 60 champs examinés par groupe.

L'oligospermie a été estimée sur la base de la quantité de spermatozoïdes présentes dans la lumière des tubes séminifères et dans le canal épидидymaire de la région proximale de la tête de l'épididyme.

- Concentration normale: contenu dense > à 80%, noté par (+++)
- Oligospermie modérée: contenu modéré ≤ 50%, noté (++)
- Oligospermie sévère: contenu léger ≤ 25%, noté (+)

L'identification des cellules de Leydig a été effectuée par l'immuno-histochimie (IHC) avec le l'inhibine. Elles sont comptés dans 10 différents champs par animale, tandis que les cellules de Sertoli sont comptés dans 5 tubes séminifères par animale (n=10), sous un microscope optique (DM750 LEICA microsystem) au grossissement 400.

5.2.1.6.1.5. Dosage de la testostérone

Le sang prélevé est centrifugé à 4000 rpm à 4°C pendant 5min, le sérum résultant est transféré dans des tubes de 1 ml en polypropylène puis stocké à -20° C. Le niveau de la testostérone a été mesuré par "Electrochemiluminescence immunoassay" (ECLIA) (IMMUNO ANALYSES COBAS ROCHE), avec une limite de détection de 025 ng/ml.

5.2.1.6.2. Descendances mâles F1 et F

5.2.1.6.2.1. DAG et poids corporel : la DAG est la distance entre l'anus et l'appareil génital, elle est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse durant toute la période de lactation, au 1,7,14 et 21^{ème} JPN pour tous les mâles de la F1 et F2. Elle est rapportée à la racine cubique du poids corporel pesé en même temps (1,7,14 et 21^{ème} JPN), comme l'indique l'article 45 de protocole 443 de l'OCDE.

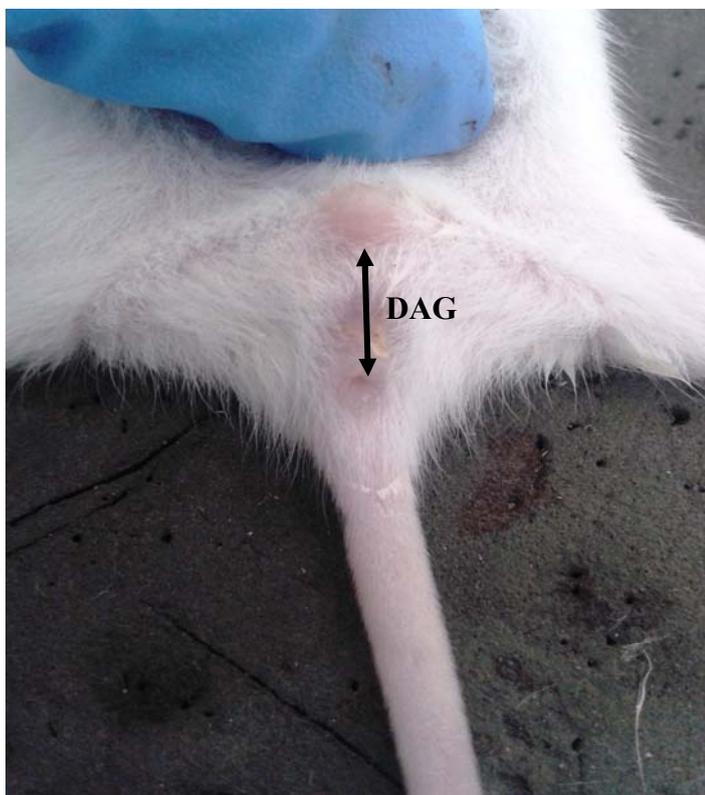


Figure 5.4: DAG chez le rat mâle

5.2.1.6.2.2. Poids des organes reproducteurs et dosage de la testostérone

Au sevrage, au moins un mâle de chaque portée de F1 (F1a) et F2 sont pesés et sacrifiés par décapitation, le sang de la plaie est récupéré dans des tubes secs, placé à froid pour le dosage de la testostérone, par la même technique décrite précédemment. Les

testicules, les épидидymes et les vésicules séminales sont prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux puis pesés.

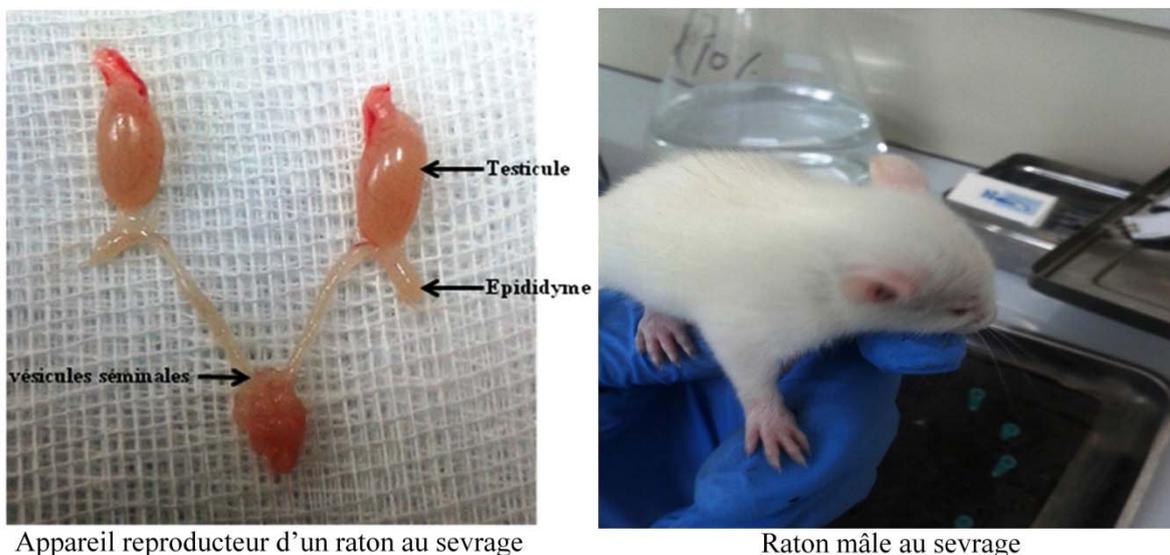


Figure 5.5: Raton mâle au sevrage et son appareil reproducteur

5.2.1.6.2.3. Puberté

A partir du 35^{ème} JPN tous les rats mâles de F1b sont quotidiennement examinés pour la progression de la séparation du prépuce (preputial separation (PPS)) qui est considéré comme l'indice principal de début de la puberté. Il est déterminé manuellement en exerçant une légère pression sur le prépuce (Figure 5.6).

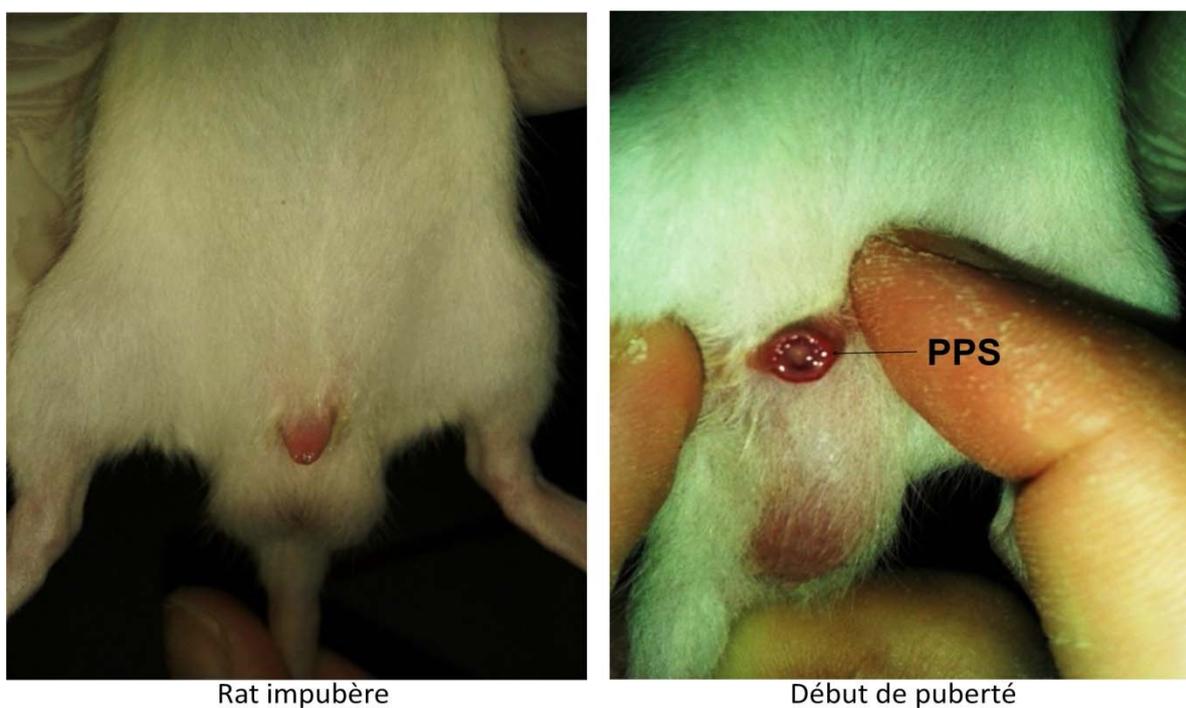


Figure 5.6: Progression de la séparation de prépuce

5.2.2. Mise au point et validation d'une méthodologie analytique pour le dosage du DEHP

Comme nous l'avons précédemment cité, le dosage du DEHP s'impose comme une exigence primordiale et problématique de santé publique de premier ordre en raison de ses effets toxiques sur le système endocrinien. Néanmoins cette tâche n'est pas aisée, particulièrement dans notre pays, en raison de l'absence totale d'un environnement adéquat et d'une démarche analytique valide pour son dosage, que ce soit par la méthode de référence ISO 18856:2004, ou par d'autres méthodes alternatives, en raison des contaminations environnementales importantes. A partir du moment où ces substances (phtalates) font l'objet d'analyses de routine dans les pays européens et soumises à une réglementation stricte, les exportateurs Algériens ainsi que les industriels agroalimentaires et pharmaceutiques se trouvent devant l'obligation de les inclure dans le bilan analytique. Mais malheureusement jusqu'à l'heure actuelle, aucun laboratoire Algérien ne parvient à lancer l'analyse des phtalates y compris le CNT qui détient la méthode de référence *ISO 18856:2004* avec tout l'appareillage nécessaire!!! Ce sont ces raisons qui nous ont poussés à prendre l'initiative dans le développement d'une méthodologie analytique valide pour le dosage du DEHP dans l'eau, en fixant les principaux objectifs suivants:

- Développement d'une démarche analytique adéquate à l'analyse du DEHP; préparation de l'environnement du laboratoire et adoption/ initiation des /aux bonnes techniques de manipulation afin de minimiser les contaminations croisées, considérées comme contraintes majeures de l'analyse des phtalates.
- La mise au point et la validation de méthode analytique alternative HPLC-UV, efficace, sensible, fiable, facile et accessible pour le dosage du DEHP.
- Optimisation d'un procédé d'extraction simple et efficace tout en minimisant le nombre de manipulations et par conséquent minimiser les contaminations.
- L'application de la méthode validée sur les eaux embouteillées dans du PET, commercialisées sur le marché Algérien.

Le travail a été réalisé à WanyLab qui est une société de services, dotée d'un laboratoire de contrôle de la qualité autorisé par le Ministère du commerce, et constitue un centre de ressources analytiques performant dans le contrôle et l'assurance de la qualité. Le laboratoire est pourvu d'installations et de matériel conforme aux exigences en vigueur pour assurer ces analyses dans le strict respect des normes.

5.2.2.1. Procédure de développement de la démarche analytique

5.2.2.1.1. Préparation du laboratoire

Avant de commencer la procédure analytique, une préparation préalable du laboratoire a été effectuée, en appliquant la démarche suivante :

- Elimination (dans la mesure du possible) tous les matériaux plastiques du laboratoire;
- Elimination de l'utilisation des agents nettoyants, qui contiennent fréquemment des phtalates et peuvent contaminer gravement l'air du laboratoire, durant toute la période de la mise en œuvre de la procédure analytique;
- Sensibilisation du personnel de laboratoire aux différentes sources de contamination qui constituent la contrainte majeure de l'analyse des phtalates:
 - Eviter l'utilisation des gants en plastique, les remplacer par des gants en nitrile ou à défaut manipuler les mains nues bien lavées à l'eau chaude sans l'utilisation du savon,
 - Eviter l'utilisation personnelle de crèmes traitantes pour les mains, parfums, déodorants, produits cosmétiques en général.
- Nettoyage des surfaces avec de l'eau ultra-pure et rinçage avec de l'acétone;

5.2.2.1.2. Prétraitement de la verrerie

- Toute la verrerie impliquée dans la procédure analytique a été nettoyée au détergent (ISIS) avec de l'eau chaude, rincée avec de l'eau ultra-pure puis avec de l'acétone et séchée à l'étuve à 105°C;
- La verrerie pré-rincée et séchée est ensuite chauffée dans un four à moufle à 400°C pendant 2 heures;
- La verrerie chauffée et refroidie est obturée à l'aide d'une feuille d'aluminium préchauffée à 400°C également (Figure 5.7) ;
- Le contact de la verrerie et des échantillons avec l'air libre du laboratoire pendant les manipulations a été minimisé au maximum



Figure 5.7: Verrerie chauffée à 400°C et obturée à l'aluminium

5.2.2.1.3. Contrôles à blanc

Pour valider les différentes étapes de la procédure, préparation du laboratoire, prétraitement de la verrerie et toutes les étapes de la procédure analytiques, des contrôles à blanc sont effectués à intervalles réguliers.

5.2.2.1.4. Mise au point et validation de la méthode HPLC-UV

L'HPLC-UV est une méthode conventionnelle qui offre l'avantage de simplicité et de disponibilité dans la plupart des laboratoires agro-alimentaires et pharmaceutiques.

5.2.2.1.4.1. Appareillage

Nous avons travaillé sur deux HPLC: HPLC-UV DIONEX UltiMate 3000 avec un détecteur de longueurs d'ondes variables (4 longueurs d'ondes) de marque Thermo-scientifique, avec un logiciel de traitement de données "Chromeleon 7", et HPLC-UV Waters de Alliance avec "Empower 3" comme logiciel de traitement de données.

5.2.2.1.4.2. Choix du blanc analytique: L'eau ultra-pure est utilisée par défaut comme blanc analytique pendant toute la procédure de validation analytique

5.2.2.1.4.3. Optimisation des conditions opératoires

Deux niveaux de concentrations (C1 et C2) en DEHP sont préparés dans de l'eau ultra-pure à partir d'une solution mère d'une concentration de 1g/l, pour l'optimisation de chacune des conditions opératoires suivantes.

- Longueur d'onde: pour fixer la longueur d'onde du DEHP une solution de 20µg/ml été préparée dans du méthanol et analysée par spectroscope UV-visible par un balayage dans la zone spectrale comprise entre 200 et 400 nm.
- Phase stationnaire: Colonne Nucleosil 100 C18, d'une longueur de 250mm et un diamètre de 4.0 mm, avec une granulométrie de 5µm a été choisie en se référant à la littérature.
- Phase mobile et débit : deux phases mobiles et deux niveaux de débit sont testés, la combinaison qui donne un temps de rétention réduit, donc durée d'analyse réduite, est retenue pour la suite de l'étude:
 - Acétonitrile/ eau: 70/30 (v/v) avec un débit de 1ml/mn
 - Acétonitrile 100% avec deux niveau de débit 1ml/mn et 0.6 ml/mn
- Volume d'injection: Fixé à 50µL

5.2.2.1.4.4. Validation de la méthode HPLC-UV

La méthode est validée selon la norme Afnor "NF T90-210 Mai 2009": "*Qualité de l'eau: Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire*" et en suivant les recommandations de STP pharma [202] : Les différents paramètres de validation sont les suivants:

- Spécificité;
- Linéarité;
- Répétabilité
- Reproductibilité
- Limite de détection (LOD);
- La limite de quantification (LOQ);
- Exactitude (recouvrement);

5.2.2.1.4.4.1. Spécificité: "La spécificité d'une méthode analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents"[202]. Dans notre travail la spécificité a été évaluée en vérifiant la

capacité de la méthode à détecter le DEHP en présence d'autres phtalates: DBP, DIBP et DOTP.

5.2.2.1.4.4.2. Linéarité (gamme d'étalonnage): "La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon" [202]. Nous l'avons vérifié sur une gamme d'étalonnage de cinq (5) solutions de concentrations différentes de 10, 20,40,50 et 100 $\mu\text{g/l}$ (fixées en se référant aux concentrations du DEHP dans l'eau minérale embouteillée dans du PET rapportées dans la littérature et qui varient du picogramme au microgramme (60 $\mu\text{g/l}$ en moyenne) sur cinq (5) jours consécutifs. Pour préparer les solutions de la gamme d'étalonnage, une solution mère de 1g/l du DEHP a été préparée dans 10ml du méthanol, puis une solution intermédiaire de 10mg/l a été préparée en prélevant 100 μl de la solution mère dans 10ml de l'eau ultra pure. Par la suite la gamme d'étalonnage de 10, 20,40,50 et 100 $\mu\text{g/l}$ a été préparée dans de l'eau ultra pure par dilutions de la solution intermédiaire.

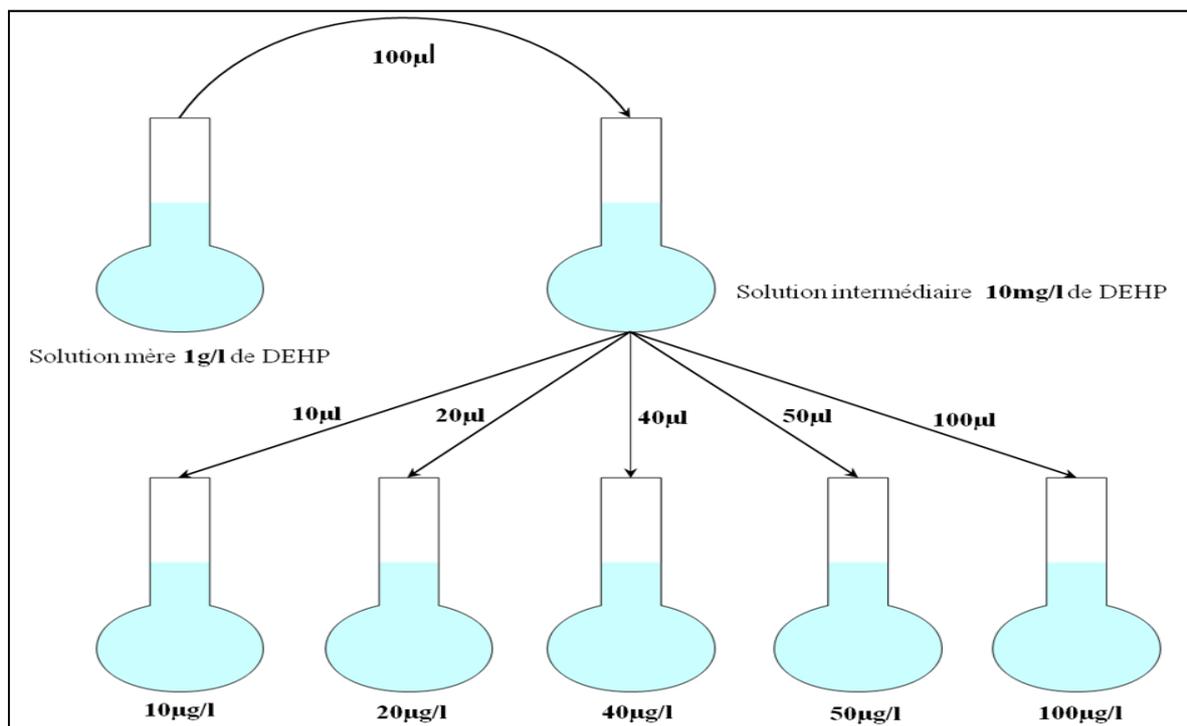


Figure 5.8: Préparation de la gamme d'étalonnage

5.2.2.1.4.4.3. Organisation des essais de validation

Comme décrit préalablement, le plan de validation a été formé de 5 niveaux de concentrations (gamme d'étalonnage: 10, 20,40,50 et 100µg/l) avec 3 mesures (répétitions) par concentration, préparées sur 5 jours consécutifs. Soit au total 75 essais. La solution mère, intermédiaire et les dilutions ont été préparées à chaque jour d'analyse.

5.2.2.1.4.4.4. Répétabilité: "conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps" [202]. Elle a été évaluée en répétant chaque mesure 3 fois pour chaque concentration de la gamme.

5.2.2.1.4.4.5. Reproductibilité: "conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents" [202]. Elle a été évaluée sur une autre HPLC-UV (Waters) avec d'autres personnels au niveau d'un autre laboratoire "service pharmaco-toxicologie de LNCPP".

5.2.2.1.4.4.6. Calcul de LOD et LOQ [203]

$$LOD = \frac{3.3 \times \sigma}{P}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{P}$$

où

P = pente de la courbe d'étalonnage

σ = écart-type de la réponse estimé de l'écart-type résiduel de la courbe de régression linéaire des aires en fonction des concentrations de références.

5.2.2.1.4.4.7. Exactitude ou recouvrement (%): "Correspond à l'étroitesse de l'accord entre la valeur obtenue par la méthode et la vraie valeur de référence" [202]. Il est calculé par le rapport entre la valeur retrouvée et la valeur de référence* 100.

5.2.2.2. Procédés de préconcentration

Comme nous l'avons précédemment cité, la présence du DEHP en traces dans l'eau, en raison de sa faible solubilité, exige le développement et l'optimisation des techniques de

préconcentration préalable à son dosage pour permettre sa détection par les instruments analytiques de routine, (HPLC avec un détecteur UV).

Deux techniques de préconcentration ont été testées; L'extraction SPE, considérée comme méthode de référence et la lyophilisation comme méthode alternative.

5.2.2.2.1. Extraction SPE

L'extraction SPE a été réalisée au centre de bioéquivalence de Saidal sur un dispositif d'extraction sous vide SPE "Waters". Les cartouches utilisées sont de type «Agilent SampliQ C18» de volume 6 ml, ayant une phase stationnaire inverse à base de silice et greffée en C18 (500 mg). Pour évaluer le rendement d'extraction, un blanc négatif et deux blancs positifs ont été préparés à une concentration de 900µg/l dans 250ml de l'eau ultra pure. Les valeurs de rendement sont calculées après soustraction de la surface du blanc négatif (eau ultra pure) des surfaces des blancs positifs. Egalement et comme indiqué dans toutes les étapes de la procédure analytique, différents blancs ont été réalisés pendant l'extraction à savoir, le blanc des cartouches SPE qui consiste à faire passer 2ml d'acétonitrile sur les cartouches avant le dépôt de l'échantillon, récupération des extraits dans des tubes en verre et les traiter comme les autres éluats. Le blanc de la paillasse qui consiste à incuber 250 ml de l'eau ultra pure et 5 ml d'Acétonitrile sur la paillasse à l'air libre pendant toute la période de l'extraction, puis extraction et traitement comme tous les autres échantillons.

Les étapes de SPE sont les suivantes (en se référant à la méthode de référence ISO 18856:2004).

- Conditionnement et nettoyage du matériau C18-RP contenu dans les cartouches comme suit:
 - Rinçage avec un volume de lit d'acétonitrile (solvant d'élution)
 - Aspiration dans le vide pendant quelques secondes pour sécher;
 - Rinçage du matériau adsorbant avec deux volumes de lit du méthanol.
- Dépôt de 250 ml d'échantillon dans les cartouches en utilisant une seringue en verre et aspiration à l'aide de dispositif à vide.
- Séchage des cartouches sous azote pendant 5 min environ à vide, l'azote étant ainsi amené directement au-dessus de la cartouche.
- Elution des cartouches avec 2 ml d'acétonitrile dans des tubes en verre, faire le vide brièvement de manière à recueillir les gouttes restantes.
- Séchage ou évaporation sous azote pendant 10mn

- Reconstitution avec 500 μ l de méthanol et agitation pendant quelques secondes
- Dosage par HPLC

La figure suivante illustre en image les différentes étapes de l'extraction SPE.

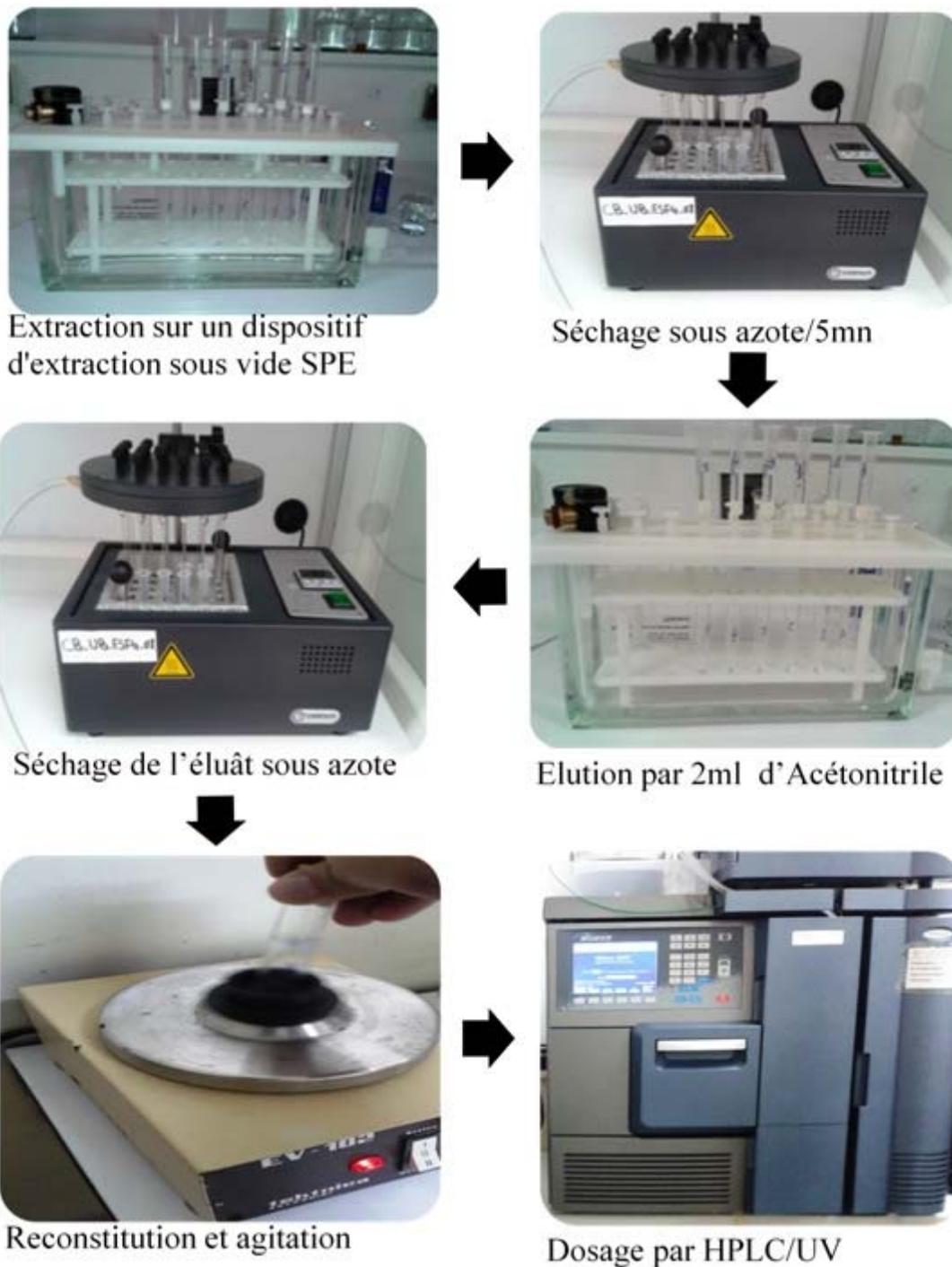


Figure 5.9 : Etapes de l'extraction SPE

5.2.2.2.2. Lyophilisation

La lyophilisation est une autre technique universelle de préconcentration, elle a été réalisée au Centre de Recherche Nucléaire d'Alger selon les étapes suivantes, en se référant aux travaux de BISCARDI et al. [93] et HIRSCH et al. [204].

- Optimisation et évaluation de rendement

Pour évaluer le rendement de la technique, deux blancs positifs à une concentration de 900 μ g/l et un blanc négatif ont été préparés dans 250ml de l'eau ultra pure, lyophilisés et analysés selon le protocole suivant:

- Congélation des échantillons de volume de 250ml à -18°C pendant 24h dans des ballons en verre
- Lyophilisation dans un lyophilisateur à ballons à une température de -60°C jusqu'à un volume de 10ml environ
- Récupération du volume restant (10ml) dans des boites de Pétri en verre
- Congélation à -18°C pendant 24h
- Lyophilisation complète dans les boites de Pétri dans un lyophilisateur simple
- Reconstitution ou dissolution de lyophilisat avec 5 ml de méthanol dans les même boites de Pétri
- Agitation pendant 2mn environ
- Injection et dosage par HPLC-UV

Les valeurs de rendement sont calculées après soustraction de la surface du blanc négatif (eau ultra pure) des surfaces des blancs positifs. La figure suivante illustre en image les différentes étapes de l'optimisation de la préconcentration par lyophilisation .

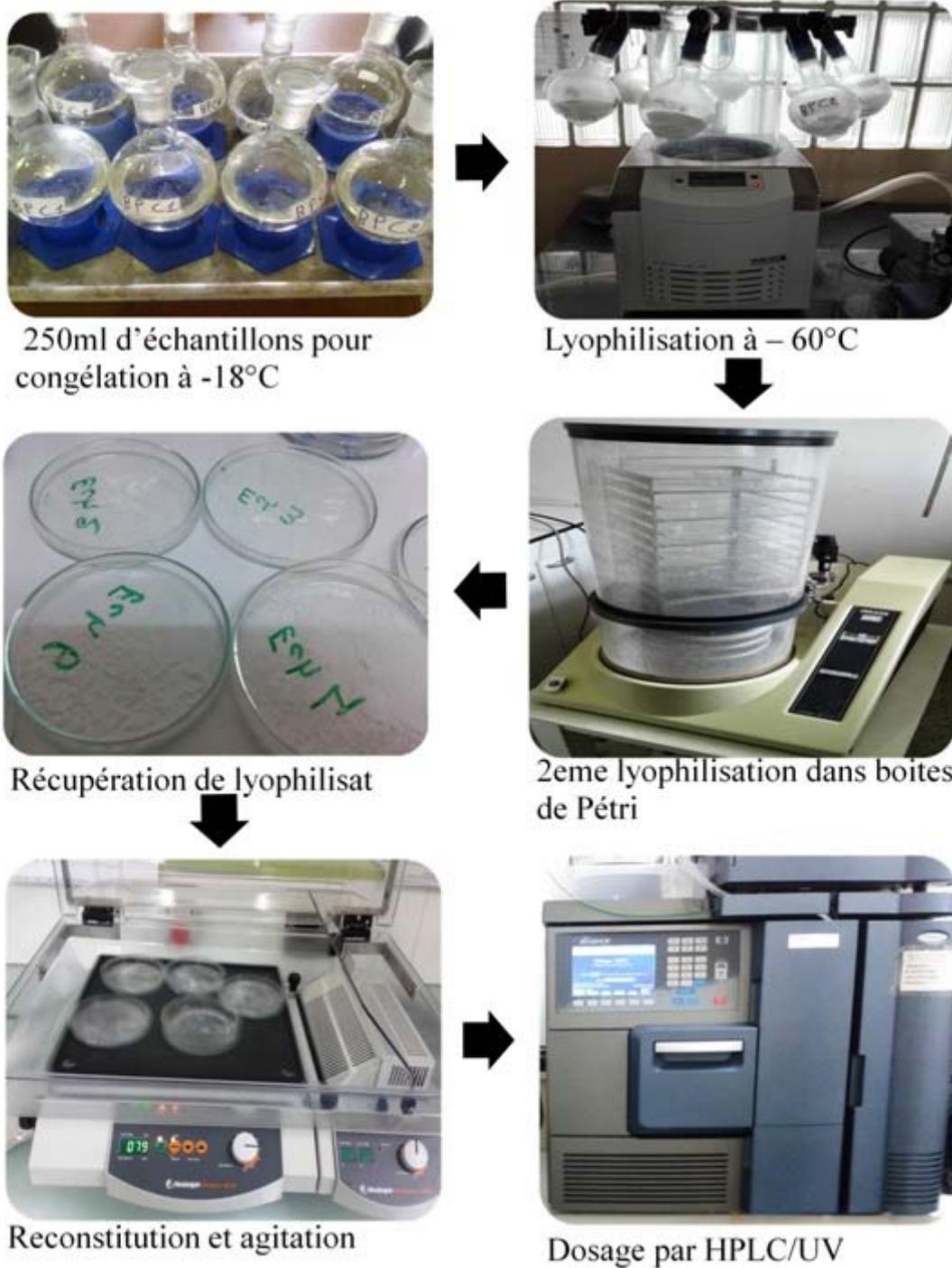


Figure 5.10: Etapes de la préconcentration par lyophilisation .

5.2.2.3. Application de la méthode validée sur les eaux embouteillées dans du PET

Six (6) bouteilles d'eau minérale en PET de volume 0.5L d'une seule marque et ayant toutes la même date de fabrication (même lot) , ont été utilisées. Le nombre d'échantillons a été fixé en fonction du nombre des cartouches SPE disponibles . Un volume d'échantillon de 250 ml et 100ml de chaque bouteille a été prélevé pour l'extraction SPE et la lyophilisation, respectivement, selon les protocoles décrits ci-dessus, cependant le volume de l'échantillon à préconcentrer par lyophilisation a été réduit à 100ml pour des raisons techniques. Tous les échantillons d'eau ont été également analysés par HPLC sans extraction . Les valeurs de concentration dans les échantillons sont calculées après soustraction de la surface du blanc (eau ultra pure) des surfaces des échantillons.

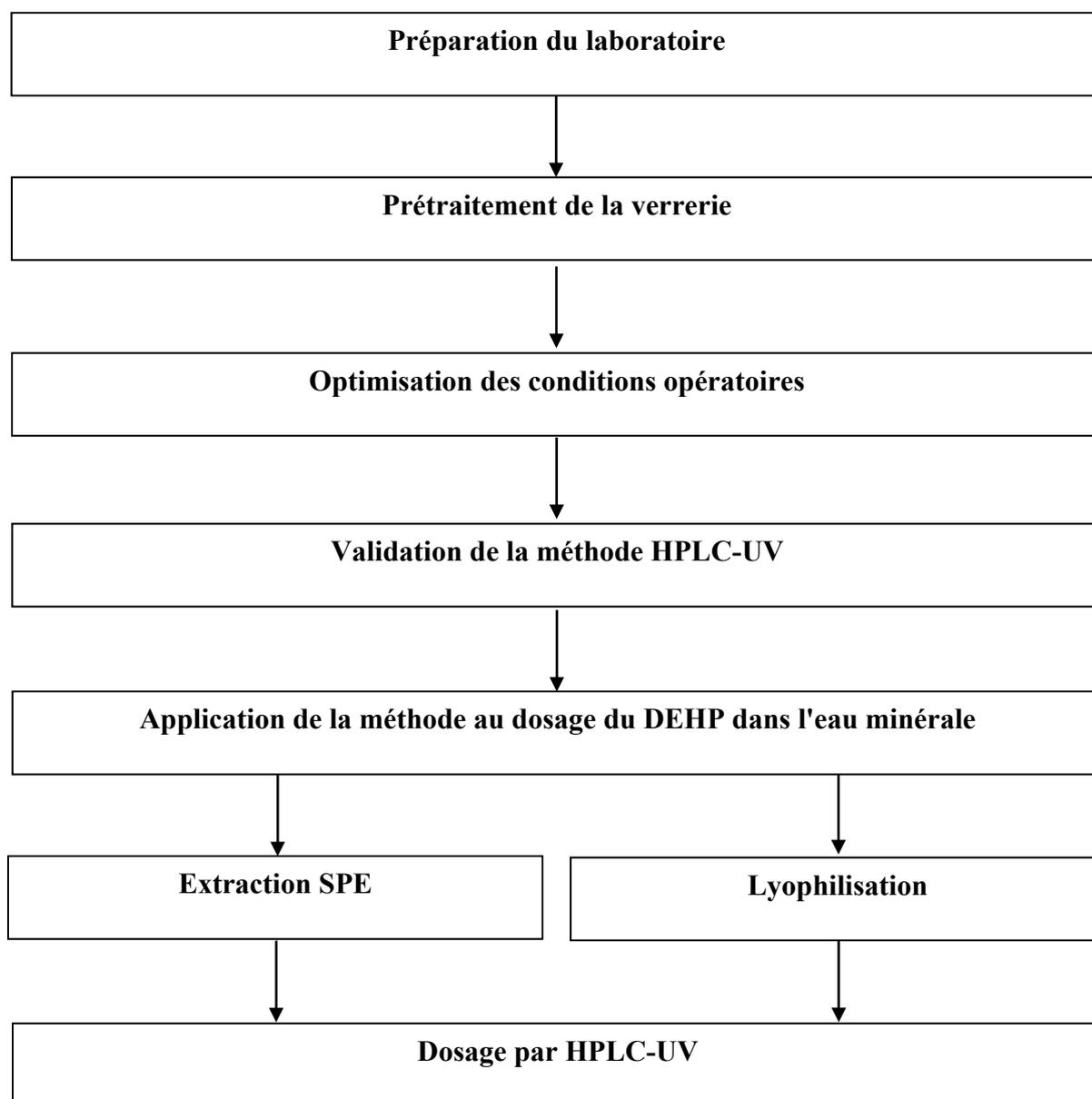


Figure 5.11: Organigramme de dosage du DEHP par HPLC-UV

5.2.3. Analyse Statistique

L'analyse statistique a été effectuée au moyen du logiciel statistique SPSS (version 2.1), les résultats sont exprimés sous forme des moyennes \pm SE (*Standard Error*). Les moyennes sont analysées par le test de la variance ANOVA, suivi par le test de Tukey post hoc. Deux modèles de régression linéaire sont utilisés pour analyser les réponses non monotoniques: le modèle de régression linéaire simple et le modèle de régression quadratique. Les différences sont considérées statistiquement significatives à $p < 0.05$. Un test de corrélation est effectué pour analyser la corrélation entre les différents paramètres reproductifs évalués. Un test de corrélation et de régression linéaire avec le calcul des RSD (%) ont été effectués pour l'analyse des paramètres de validation analytique.

CHAPITRE 6

RESULTATS

6.1. Résultats de l'étude trans-générationnelle de reprotoxicité à faibles doses du DEHP

6.1.1.Indices de reproduction des générations F0 et F1 paternelles

La fertilité et la taille de la portée sont les deux indices qui ont été fortement affectés, d'une manière dose-dépendante, chez les mâles F0 exposés aux faibles doses du DEHP pendant la période pré-pubertaire, pubertaire et pos-pubertaire (de 21^{ème} au 120^{ème} JPN). En effet, presque la totalité (90%) des rats exposés à 5000 µg/kgPC/j (considérée par la réglementation comme étant une dose sans effets chez les rats) et la moitié (56%) des rats exposés à 50µg/kgPC/j (Considérée comme une dose journalière tolérable 'dose saine' chez l'Homme) ont été infertiles, comparativement au groupe témoin (tableau 6.1). Par conséquence la dose 5000 µg/kgPC/j a été éliminée de la suite de l'étude. L'indice de taille de portée a connu également une diminution significative de 40% (p=0.003) et 10% (p=0.3) à 50 µg/kgPC/j et à 0.5µg/kgPC/j, respectivement. Le sexe ration a réduit de 1.05 ± 0.15 chez le groupe témoin, à 0.73 ± 0.16 à 50µg/kgPC/j (p=0.8), par contre à 0.5µg/kgPC/j, il a augmenté jusqu'à 1.58 ± 0.46 (p=0.4). Tandis que chez la génération paternelle F1 (descendance de F0, exposée in utero et pendant la lactation ainsi que via l'exposition de son génome paternel), tous les indices de reproduction n'ont pas été affectés, à l'exception de sexe ratio qui a noté une augmentation dose dépendante, il a passé de 1.32 ± 0.18 chez le groupe témoin, vers 1.57 ± 0.51 et 2.02 ± 0.65 à 0.5 et 50µg/kgPC/d, respectivement (tableau 6.1).

Tableau 6.1: Indices de reproduction de F0 et F1 parentales

	F0 parentale				F1 parentale		
	DEHP ($\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{d}$)				DEHP ($\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{d}$)		
	0	0.5	50	5000	0	0.5	50
Nombre de couples ($\sigma : \phi$)	20	21	19	20	19	18	14
Femelles gravides	19	19	8	2	19	18	13
Indice de fertilité (%)	95.45	90.47	42.10*	10.00**	100	100	92.85
Nombre de portée	19	16	8	/	19	18	13
Indice de gestation (%)	95.23	84.21	100	/	100	100	100
Taille de portée	10.68 \pm 0.41	9.62 \pm 0.68	7.37 \pm 0.56**	/	10.15 \pm 0.31	9.27 \pm 0.52	9.84 \pm 0.43
sexe ratio	1.05 \pm 0.15	1.58 \pm 0.46	0.73 \pm 0.16	/	1.32 \pm 0.18	1.57 \pm 0.51	2.02 \pm 0.65
% des mâles nés	49.99 \pm 4.23	52.58 \pm 3.72	38.30 \pm 6.40	/	52.58 \pm 3.29	50.06 \pm 4.16	54.78 \pm 5.65
Indice de survie au 1JPN	95.14 \pm 4.85	95.31 \pm 4.68	89.58 \pm 10.41	/	100 \pm 0.00	100 \pm 0.00	100 \pm 0.00
Indice de survie au 21JPN	94.73 \pm 5.26	93.30 \pm 6.23	92.91 \pm 5.13	/	95.26 \pm 2.00	97.33 \pm 1.27	99.30 \pm 0.69

6.1.2. Paramètres de reproduction des générations paternelles F0 et F1

6.1.2.1. Concentration spermatique

Les résultats des spermogrammes ont montré que la concentration spermatique a été fortement altérée chez les deux générations paternelles F0 et F1 presque au même ordre. Effet, une réduction de 46%, 24% et 41% a été observée chez la génération F0 aux doses 5000, 50 et 0.5 µg/kgPC/j, respectivement, comparativement au groupe témoin (ANOVA $p=0.01$). Parallèlement une réduction de 47% avec un cas d'azoospermie et 38% a été observée chez la génération F1 aux doses 50 et 0.5 µg/kgPC/J, respectivement, comparativement au groupe témoin (ANOVA, $p=0.000$) (Figure 6.1).

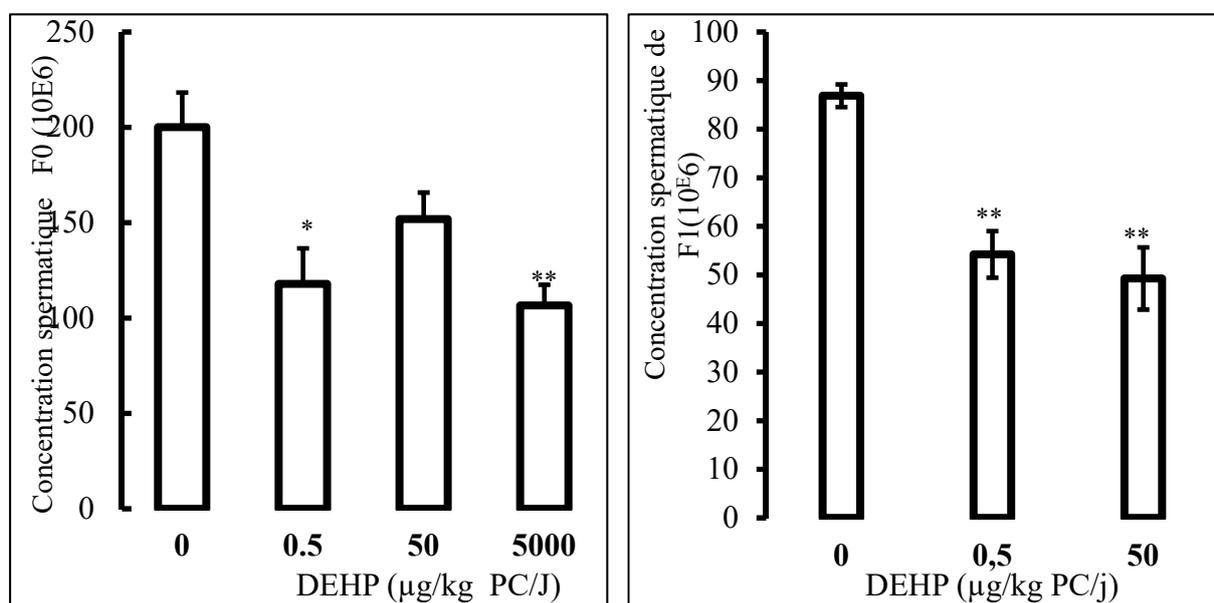


Figure 6.1: Effets d'exposition aux faibles doses du DEHP sur la concentration spermatique des générations paternelles F0 et F1 au 120^{ème} JPN. Chaque barre représente la moyenne spermatique par gramme du poids relatif de la tête épидidymaire \pm SE. *, ** représentent une différence significative comparativement au groupe témoin (ANOVA, $p<0.05$, $p<0.01$) ($n = 10$ /groupe).

6.1.2.2. Motilité spermatique de F0

L'exposition pré-pubertaire, pubertaire et post-pubertaire au DEHP paraît sans effets significatifs sur la motilité des spermatozoïdes (ANOVA $p= 0.3$), néanmoins une légère diminution de 29%, 18.63% et 9% a été observée à 5000, 50 et 0.5 µg/kgPC/j, respectivement (tableau 6.2).

6.1.2.3. Testostérone

Le niveau de la testostérone mesuré chez F0 au 120^{ème} JPN a été significativement affecté par l'exposition aux faibles doses du DEHP, (ANOVA $p= 0.006$). En effet, une augmentation significative de la testostérone (2.64 ± 0.5 ng/ml) a été observée à la dose intermédiaire $50 \mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{j}$ ($p= 0.01$), comparativement au groupe témoin (1.24 ± 0.15 ng/ml). Par contre, aucun effet n'est observé à $5000\mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{J}$, et une légère augmentation non significative ($p= 0.34$) à la plus faible dose testée $0.5\mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{j}$ ($1.98 \pm 0.18\text{ng}/\text{ml}$).

L'allure de ces résultats indique une relation dose-effet non linéaire, sous forme d'un "U" inversé. Afin de vérifier ce modèle de réponse, nous avons analysé ses résultats en utilisant les deux types de régression cités dans matériel et méthodes. Le modèle de régression linéaire simple a donné un $p = 0.9$ avec un faible coefficient de détermination $R^2=0.01$, ce qui indique que ce modèle linéaire n'est pas valide. Par ailleurs, lorsque la fonction quadratique a été ajoutée au modèle linéaire, un $p=0.3$ et $R^2 = 0.85$ ont été obtenus, indiquant que ce modèle quadratique convient et explique mieux la relation dose effet des résultats de la testostérone.

Par contre, chez la génération F1, une réduction de la testostérone dose-dépendante de 20 % et 38% été observée à 0.5 et $50\mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{j}$, respectivement (figure 6.2). Néanmoins cette réduction n'est pas statistiquement significative (ANOVA, $p=0.4$).

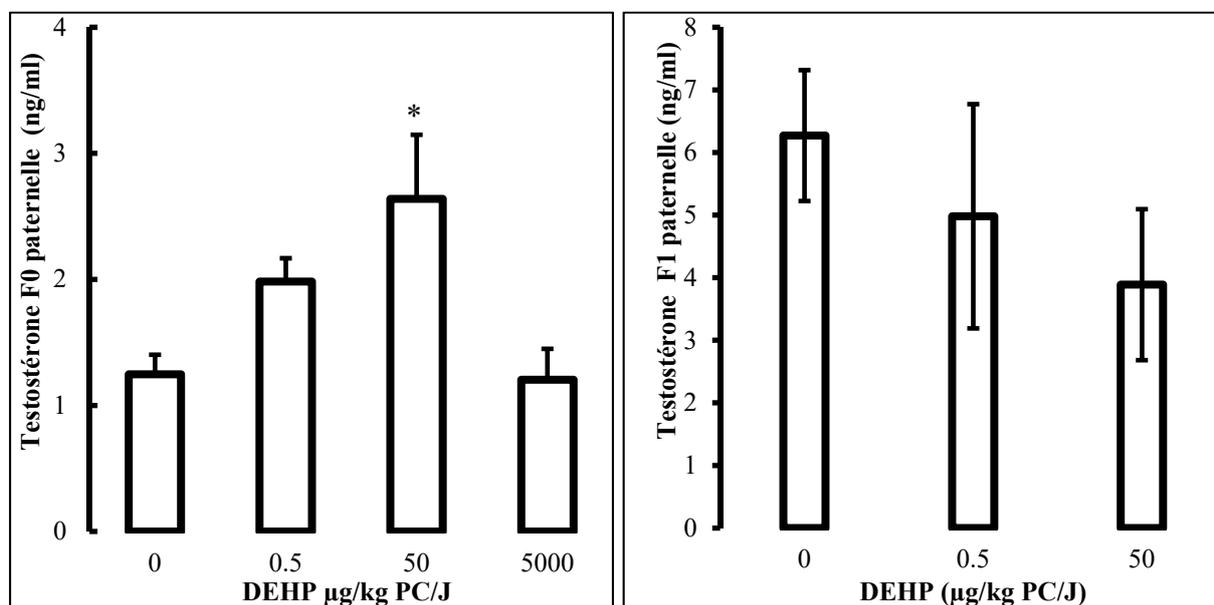


Figure 6.2: Effets d'exposition aux faibles doses du DEHP sur le niveau de la testostérone des générations paternelles F0 et F1 au 120^{ème} JPN. * représente une différence significative comparativement au groupe témoin (ANOVA, $p<0.05$) ($n = 10/\text{groupe}$).

6.1.2.4. Poids corporel et poids des organes reproducteurs

L'exposition aux différentes faibles doses de DEHP paraît sans effets significatifs sur le poids corporel des deux générations paternelles F0 et F1 ainsi que sur le poids des organes reproducteurs de la génération F1 (tableau 6.2), à l'exception d'un seul cas azospermique exposé à 50 µg/kg, qui avait des organes reproducteurs atrophiés, comme indiqué sur la figure suivante:



Figure 6.3: Testicule d'un rat de F1 azospermique et d'un rat témoin

Concernant le poids des organes reproducteurs de la génération paternelle F0 (tableau 6.2), une diminution significative, dose-dépendante, a été observée dans tous les groupes traités, comparativement au groupe témoins; le poids absolu des testicules a noté une réduction de 6 % ($p=0.68$), 15 % ($p=0.04$) et 32 % ($p=0.000$) à 0.5, 50 et 5000 µg/kg PC/J, respectivement. De même, le poids absolu de l'épididyme a diminué de 14 % ($p=0.005$), 25 % ($p=0.000$) et 33% ($p=0.000$) à 0.5, 50 et 5000 µg/kgPC/j, respectivement. Le poids relatif de l'épididyme a révélé un effet significatif uniquement à 5000µg/kgPC/j avec une diminution de 16% ($p=0.001$).

Quant au poids relatif des testicules, nous avons constaté une relation dose effet non linéaire, tout comme la testostérone, avec une augmentation significative de (19%) à 0.5µg/kgPC/j, et inversement une diminution significative de 17% à 5000µg/kgPC/j (tableau 6.2). Ces résultats ont été également analysés par les deux modèles de régression cités auparavant, le modèle linéaire a donné $p = 0.41$ et un $R^2 = 0.34$, par contre le modèle

quadratique a donné un $p = 0.29$ et $R^2 = 0.91$, indiquant encore une fois que ce modèle quadratique représente mieux la relation dose-effet.

Tableau 6.2: Poids de testicules, épидидymes et corporel des générations paternelles F0 et F1

		DEHP doses ($\mu\text{g}/\text{kg BW}/\text{d}$)			
		0 ($n=10$)	0.5 ($n=10$)	50 ($n=10$)	5000 ($n=10$)
F0 paternelle	Poids corporel	343.7 \pm 6.40	314.4 \pm 9.04	332.9 \pm 9.36	323.9 \pm 10.91
	PA Testicule	1.64 \pm 0.047	1.54 \pm 0.063	1.39 \pm 0.055*	1.1 \pm 0.079**
	PA Epididymes	0.27 \pm 0.006	0.23 \pm 0.009*	0.20 \pm 0.005**	0.18 \pm 0.007**
	PR Testicule	0.4 \pm 0.014	0.49 \pm 0.016*	0.42 \pm 0.018	0.34 \pm 0.019*
	PR Epididymes	0.068 \pm 0.001	0.074 \pm 0.002	0.062 \pm 0.002	0.057 \pm 0.001**
	Motilité (%)	44.55 \pm 3.17	40.37 \pm 3.39	36.25 \pm 3.51	33.59 \pm 6.27
F1 paternelle	Poids corporel	322 \pm 8.1	304 \pm 5.6	304 \pm 8.06	
	PA Testicule	1,50 \pm 0.03	1,46 \pm 0.04	1,36 \pm 0.08	
	PA Epididymes	0,22 \pm 0.008	0,21 \pm 0.004	0,20 \pm 0.009	
	PR Testicule	0,46 \pm 0.008	0,48 \pm 0.01	0,45 \pm 0.03	
	PR Epididymes	0,07 \pm 0.002	0,07 \pm 0.001	0,06 \pm 0.003	

Résultats exprimés en moyenne \pm SE. (ANOVA $p < 0.05$).

Poids en (g), PA: Poids absolu, PR: Poids relatif

*différence significative à $p < 0.05$ (Tukey test)

** différence significative à $p < 0.01$ (Tukey test)

6.1.2.5. Examen histopathologique des testicules et épидидymes de F0 paternelle.

Les résultats de l'examen histopathologique de l'épididyme rejoignent ceux de spermogramme (concentration de spermatique), en effet, les spermatozoïdes sont partiellement ou totalement absents dans le canal épидидymaire; 8/10 cas d'oligospermie dont 2 cas sévères, sont observés à 5000 $\mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{j}$ (figure 6.4.D), 6/10 d'oligospermie modérée à la dose intermédiaire 50 $\mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{j}$ (figure 6.4.C) et 6/10 d'oligospermie avec 2 cas sévères à 0.5 $\mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{j}$ (figure 6.4.B). Aucun cas d'azoospermie n'est observé dans tous les groupes traités (tableau 6.3, figure 6.4).

L'analyse des testicules a révélé la présence de spermatozoïdes soit en petite quantité ou complètement absents, en fonction de tube séminifère analysé, à 5000 et 0.5 $\mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{j}$ (figure 6.4.H et F, respectivement), avec un cas de dégénérescence vacuolaire

dans chacune des doses. Par contre la dose intermédiaire 50µg/kgPC/j, les spermatozoïdes sont soit pleinement présentes dans la lumière des tubes soit complètement absentes, en fonction des tubes examinés (figure 6.4.G). Tandis que les spermatides ainsi que les différents stades de la spermatogénèse; spermatocytes et spermatogonies, sont observés dans tous les tubes examinés.

Tableau 6.3: Lésions histologiques dans le testicule et épидидyme de rats F0 au 120^{ème} JPN

Paramètres		DEHP µg/kg PC/J			
		0 (n=10)	0.5 (n=10)	50 (n=10)	5000 (n=10)
Epididyme					
Dispersion	Epars	0	7	7	10
	Non epars	10	3	3	0
Azoospermie		0	0	0	0
Oligospermie sévère (<25%)		0	2	0	2
Oligospermie modérée (~50%)		1	4	6	6
Dense (>80 %)		9	4	4	2
Testicule					
Tubes Séminifères					
Dégénérescence vacuolaire		0	1	0	1
Ø Sertoli/ tube séminifère		13.6± 0.77	12.8±0.68	10.6±0.84*	7.80± 0.69**
Spermatides		> 80%	>80%	>80 %	>80%
Spermatozoïdes		> 80%	<50%	~ 60 %	<25%
tissu Interstitiel					
Ø Leydig/champ		12.20±0.61	11.5±0.63	16.5±1.03*	9.6 ± 0.85

Sertoli and Leydig cells number results are expressed as mean ± SE. (ANOVA p< 0. 05).

*Significantly different from the control group, p< 0.05 (Tukey test)

** Significantly different from the control group, p< 0.01 (Tukey test)

Concernant les cellules de Sertoli, le comptage a révélé une réduction significative en dose-dépendante, de 22 % (p=0.03) et 42 % (p=0.000) à 50 et 5000 µg/kg PC/j respectivement. Par contre le nombre des cellules de Leydig a noté une augmentation significative de 35% (p=0.03) à 50µg/kgPC/j (figure 6.5), et une réduction de 21%, bien que non significative p=0.12, à 5000µg/kgPC/J. Aucun effet n'est observé à 0.5µg/kgPC/j.

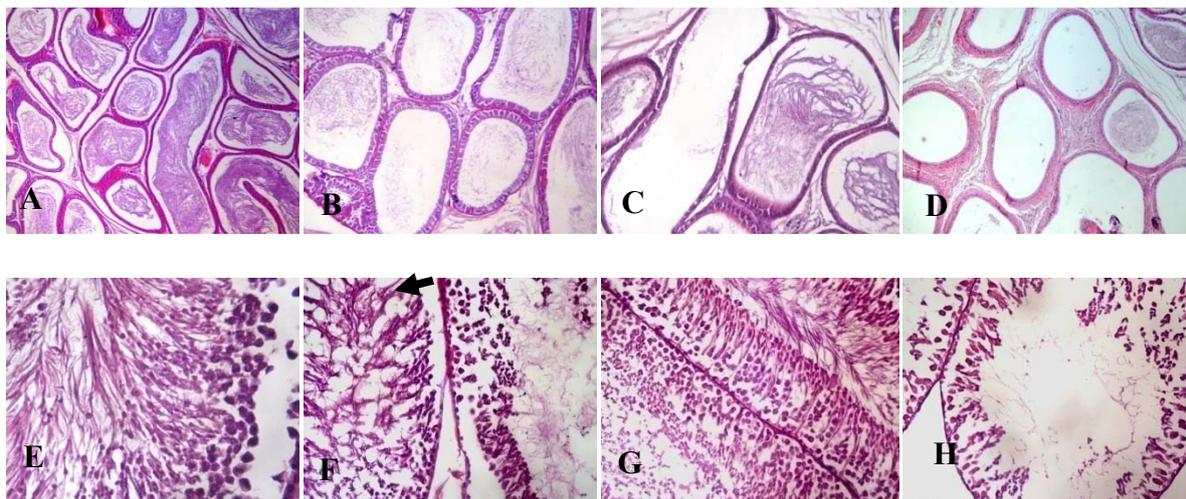


Figure 6.4. Coupes histologiques longitudinales des testicules et épидидymes de rats F0 au 120^{ème} JPN.

A: (4x) Epididyme d'un rat témoin, le canal est plein de spermatozoïdes. B et C: (10x) Epididyme d'un rat exposé à 50 et 0.5 µg/kg PC/j respectivement, le canal est partiellement plein de spermatozoïdes. D: (10x) Epididyme d'un rat exposé à 5000 µg/kg PC/j, le canal est presque vide, très peu de spermatozoïdes. E: (40x) Testicule d'un rat témoin. F: (20x) testicule d'un rat exposé à 0.5 µg/kg PC/j, les spermatozoïdes sont présents en petite quantité avec une dégénérescence vacuolaire (flèche); G: (20x) Testicule d'un rat exposé à 50 µg/kg PC/j, les spermatozoïdes sont soit présents en bonne quantité soit totalement absents. H: (20x) testicule d'un rat exposé à 5000 µg/kg PC/j, presque absence de spermatozoïdes.

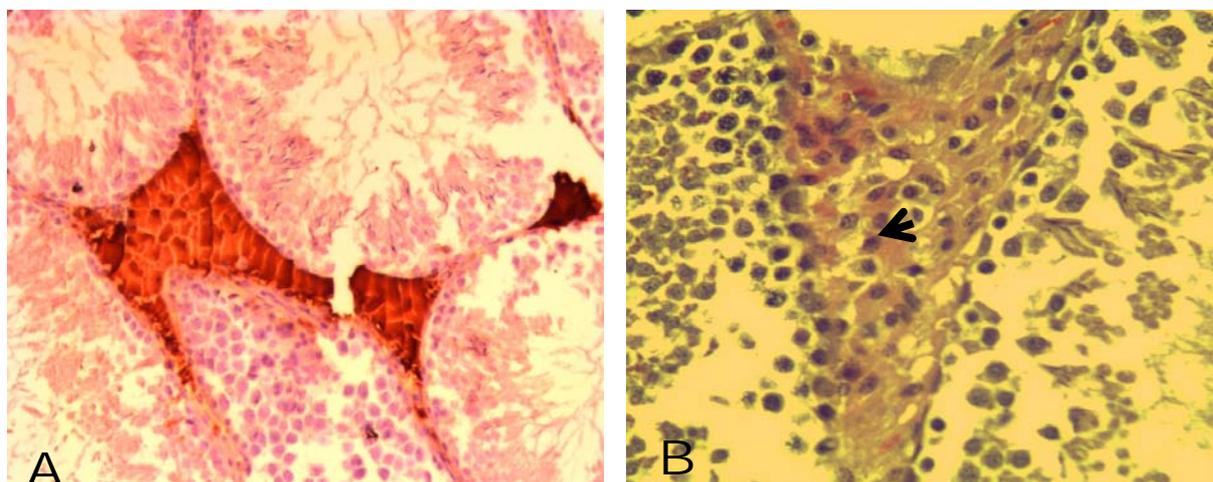


Figure 6.5: A. Amas de cellules de Leydig révélés par IHC (10x), B. Hyperplasie des cellules de Leydig H&E (40x) à 50 µg/kg PC/j.

6.1.2.6. Examen histopathologique des testicules et épидидymes de F1 paternelle

L'examen histopathologique de l'épididyme a révélé 1 cas d'azoospermie, absence de spermatozoïdes dans le canal épидидymaire (figure 6.6.C). 6 cas d'oligospermie sévère et 2 cas modérée à la dose de 50µg/kg PC/J (tableau 6.4). A 0.5 µg/kg PC/J nous avons observé 5 cas d'oligospermie sévère et 2 modéré, le canal épидидymaire est vide, partiellement vide ou plein en spermatozoïdes (figure 6.6.B) . Chez le groupe témoin nous avons observé uniquement 2 cas d'oligospermie modérée, le canal épидидymaire est bien plein en spermatozoïdes (tableau 6.4, figure 6.6.A).

L'examen de testicule a révélé des lésions histologiques importantes incluant une dégénérescence cellulaire et vacuolaire (5 cas) avec absence de spermatozoïdes et altération de la lignée germinale (1 cas) chez les rats F1 traités avec 50 µg/kg PC/j (tableau 6.4, figure 6.6.F). Par contre à 0.5 µg/kg PC/j, aucun cas de dégénérescence n'a été observé, les spermatozoïdes sont présents à des quantités variables dans la lumière des tubes séminifères (figure 6.6.E, tableau 6.4). Chez les témoins, la structure des tubes séminifères est intacte (figure 6.6.D).

Tableau 6.4: lésions histologiques dans le testicule et épидидyme des rats F1 au 120^{ème} JPN

Paramètres	0 (n=10)	0.5 (n=10)	50 (n=10)
Epididymes			
Azoospermie	0	0	1
Oligospermie sévère (<25%)	0	5	6
Oligospermie modérée (~50%)	2	2	2
Dense (>80 %)	8	3	1
Testicule			
Tubes Séminifères			
Dégénérescence vacuolaire	0	0	5
Spermatides	> 80 %	> 80 %	> 80 %
Spermatozoïdes	> 80 %	60 %	40 %

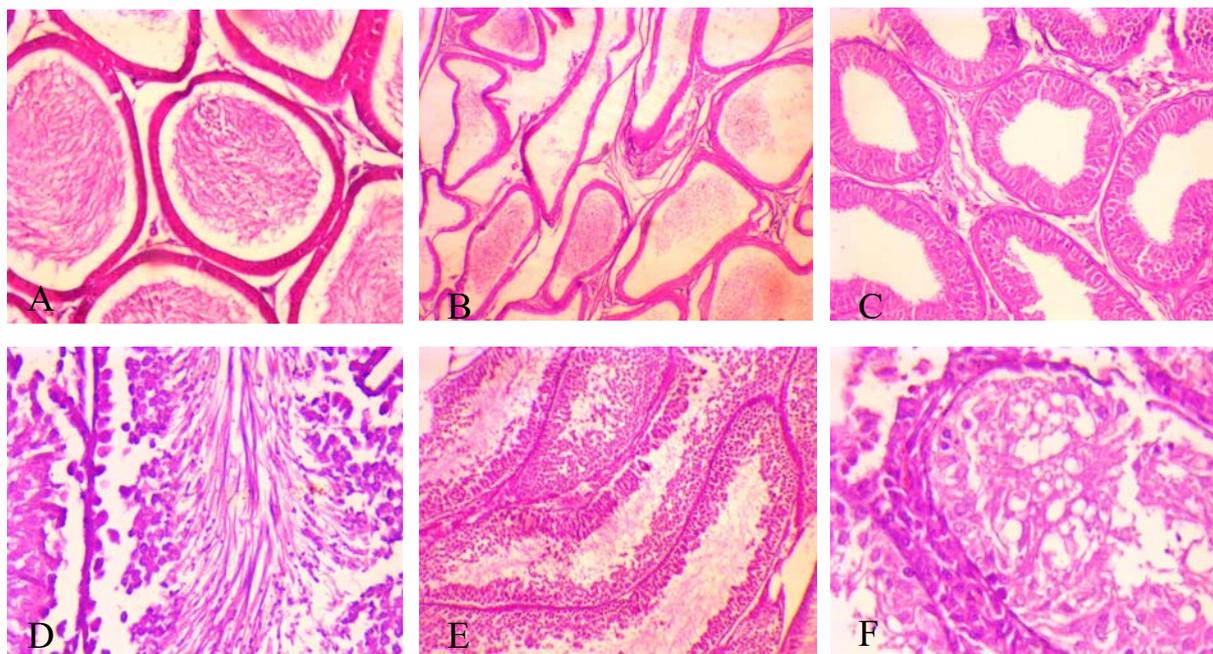


Figure 6.6: Coupes histologiques longitudinales des testicules et épидидymes de rats F1 au 120^{ème} JPN.

A: (4x) Epididyme d'un rat témoin, le canal est plein de spermatozoïdes. B: (4x) Epididyme d'un rat exposé à 0.5 µg/kg PC/j, le canal est partiellement vide de spermatozoïdes. C: (4x) Epididyme d'un rat exposé à 50 µg/kg PC/j, Azoospermie, absence totale de spermatozoïdes. D: (10x) Testicule d'un rat témoin. E: (4x) testicule d'un rat exposé à 0.5 µg/kgPC/J, les spermatozoïdes sont présents en petite quantité ou absents. F: (25x) Testicule d'un rat exposé à 50 µg/kg PC/j, dégénérescence cellulaire et vacuolaire, altération de la lignée germinale, azoospermie et hyperplasie des cellules de Leydig.

6.1.3. Descendance mâle F1 et F2 immatures (au sevrage)

6.1.3.1.Poids corporel

L'exposition des rats de la génération F1 au 0.5 µg/kgPC/j du DEHP via la voie placentaire pendant la gestation et via le lait maternel pendant la lactation, a significativement réduit le poids corporel au 7^{ème} et 14^{ème} JPN, de 11.71 ± 0.17 (g) et 19.21 ± 0.22 (g) chez les témoins, respectivement, vers 10.44 ± 0.18 (g) ($p=0.000$) et 17.31 ± 0.41 (g) ($p=0.000$), respectivement. Tandis que la dose 50µg/kgPC/j a augmenté le poids au 14^{ème} et 21^{ème} JPN, de 19.21 ± 0.22 (g) et 27.22 ± 0.39 (g) chez les témoins, respectivement, vers 21.01 ± 0.53 (g) ($p=0.03$), et 31.79 ± 1.05 (g) ($p=0.001$), respectivement.

Par contre le poids corporel de la descendance F2, qui n'a pas été exposée directement au DEHP, a été affecté uniquement à la naissance, il diminué de 6.79 ± 0.07 (g) chez les témoins vers 6.40 ± 0.08 (g) ($p=0.01$) et 6.51 ± 0.07 (g) ($p=0.03$) à 0.5 et 50 µg/kgPC/j, respectivement (tableau 6.5).

6.1.3.2. DAG

La DAG des deux générations F1 et F2 a été significativement réduite en dose-dépendante, chez les groupes traités comparativement aux témoins ($p=0.000$) (tableau 6.5); A la naissance (1erJPN), la DAG de F1 a diminué de $1.56 \pm 0.01(\text{mm/g}^{1/3})$ chez les témoins, vers $1.40 \pm 0.01(\text{mm/g}^{1/3})$ ($p=0.000$) et $1.27 \pm 0.03 (\text{mm/g}^{1/3})$ ($p=0.000$) à $0.5\mu\text{g/kgPC/d}$ et $50\mu\text{g/kg PC/d}$ respectivement, et la DAG de F2 a diminué de $1.60 \pm 0.01 (\text{mm/g}^{1/3})$ chez les témoins, vers $1.47 \pm 0.02 (\text{mm/g}^{1/3})$ ($p=0.001$) et $1.32 \pm 0.03 (\text{mm/g}^{1/3})$ ($p=0.000$) à $0.5\mu\text{g/kgPC/j}$ et $50\mu\text{g/kgPC/j}$, respectivement.

Egalement au sevrage (21^{ème} JPN), la DAG de F1 a diminué de $3.72 \pm 0.03(\text{mm/g}^{1/3})$ chez les témoins vers $3.57 \pm 0.04 (\text{mm/g}^{1/3})$ ($p=0.01$) et $3.43 \pm 0.08 (\text{mm/g}^{1/3})$ ($p=0.002$) à $0.5\mu\text{g/kg PC/J}$ et $50\mu\text{g/kg PC/J}$, respectivement, et la DAG de F2 a diminué de $3.77 \pm 0.02 (\text{mm/g}^{1/3})$ chez les témoins vers $3.46 \pm 0.03 (\text{mm/g}^{1/3})$ ($p=0.000$) et 3.36 ± 0.02 ($p=0.000$) à $0.5\mu\text{g/kgPC/j}$ et $50\mu\text{g/kgPC/j}$, respectivement (tableau 6.5).

Tableau 6.5: Evolution pondérale et de la DAG durant la lactation des générations F1 et F2

		DEHP ($\mu\text{g/kg PC/J}$)					
		0		0.5		50	
		PC (g)	DAG (mm/g)	PC (g)	DAG (mm/g)	PC (g)	DAG (mm/g)
F1	PND 1	6.62 ± 0.08	1.56 ± 0.01	6.35 ± 0.11	$1.40 \pm 0.01^{**}$	6.5 ± 0.23	$1.27 \pm 0.03^{**}$
	PND 7	11.71 ± 0.17	1.81 ± 0.01	$10.44 \pm 0.18^{**}$	$1.66 \pm 0.02^{**}$	12.22 ± 0.39	$1.49 \pm 0.03^{**}$
	PND 14	19.21 ± 0.22	2.79 ± 0.01	$17.31 \pm 0.41^{**}$	$2.57 \pm 0.01^{**}$	$21.01 \pm 0.53^*$	$2.55 \pm 0.02^{**}$
	PND 21	27.22 ± 0.39	3.72 ± 0.03	25.65 ± 0.70	$3.57 \pm 0.04^{**}$	$31.79 \pm 1.05^{**}$	$3.43 \pm 0.08^{**}$
F2	PND 1	6.79 ± 0.07	1.60 ± 0.01	$6.40 \pm 0.08^{**}$	$1.47 \pm 0.02^{**}$	$6.51 \pm 0.07^*$	$1.32 \pm 0.03^{**}$
	PND 7	11.17 ± 0.14	1.98 ± 0.01	10.78 ± 0.17	1.98 ± 0.18	11.31 ± 0.18	1.68 ± 0.02
	PND 14	17.67 ± 0.24	2.43 ± 0.01	17.46 ± 0.30	$2.35 \pm 0.02^{**}$	17.59 ± 0.31	$2.34 \pm 0.02^{**}$
	PND 21	23.66 ± 0.41	3.77 ± 0.02	22.74 ± 0.51	$3.46 \pm 0.03^{**}$	22.99 ± 0.47	$3.36 \pm 0.02^{**}$

AGD is normalized to the cube root of the body weight (Ratio of AGD to the cube root of body weight)

F1: n= 91, 73 and 21 at 0, 0.5 and 50 $\mu\text{g/kgBW/d}$

F2: n= 94, 80 and 69 at 0, 0.5 and 50 $\mu\text{g/kgBW/d}$

6.1.3.3. Poids des organes reproducteurs

Le poids des testicules, épидидymes et vésicules séminales au sevrage des générations F1 et F2 n'ont pas été affectés, à l'exception d'une diminution de 14% du poids relatif des testicules de F1, observée au $50\mu\text{g/kg PC/j}$ ($p=0.008$) (Tableau 6.6).

6.1.3.4. Testostérone

Le niveau de la testostérone au sevrage des deux générations F1 et F2, n'a pas été affecté significativement chez les deux groupes traités comparativement au témoin (Tableau 6.6). Néanmoins une légère augmentation a été notée chez la descendance F2 où le niveau de la testostérone a passé de 0.09 ± 0.01 (ng/ml) chez le groupe témoin, vers 0.18 ± 0.05 et 0.17 ± 0.06 (ng/ml) à 0.5 et 50 $\mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{j}$, respectivement ($p=0.3$) (Tableau 6.6).

Tableau 6.6: Testostérone et poids des organes reproducteurs de descendance F1 et F2

	Descendance F1 au 21 JPN			Descendance F2 au 21 JPN		
	DEHP ($\mu\text{g}/\text{kg PC}/\text{J}$)			DEHP ($\mu\text{g}/\text{kg PC}/\text{J}$)		
	0 (n=18)	0.5 (n=14)	50 (n=7)	0 (n=19)	0.5 (n=18)	50 (n=18)
Poids absolu (mg)						
Testicules	79 ± 2	70 ± 4	70 ± 7	110 ± 40	60 ± 3	70 ± 3
Epididymes	6 ± 0.2	6 ± 0.3	7 ± 0.5	9 ± 3	5 ± 1	4 ± 0.2
Vésicule séminale	27 ± 1	20 ± 1	20 ± 2	23 ± 8	20 ± 1	20 ± 0.8
Poids relatif (mg)						
Testicules	280 ± 3	280 ± 5	$240 \pm 17^{**}$	400 ± 120	270 ± 4	280 ± 7
Epididymes	24 ± 0.8	24 ± 1	22 ± 1	30 ± 10	20 ± 4	10 ± 7
Vésicule séminale	98 ± 4	100 ± 5	80 ± 4	90 ± 4	80 ± 3	80 ± 3
Testostérone (ng/ml)	0.26 ± 0.06	0.27 ± 0.53	0.27 ± 0.100	0.09 ± 0.01	0.18 ± 0.05	0.17 ± 0.06

6.1.3.5. Puberté de F1

Les résultats de progression de la séparation de prépuce ont montré une puberté précoce de la génération F1 (comme le montre bien la figure 6.7) qui s'est installée au 38.61 ± 0.11 et 38.50 ± 0.13 jours à 0.5 et 50 $\mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{j}$ du DEHP, respectivement ($p=0.000$), contre 42.16 ± 0.23 jours chez le groupe témoins.

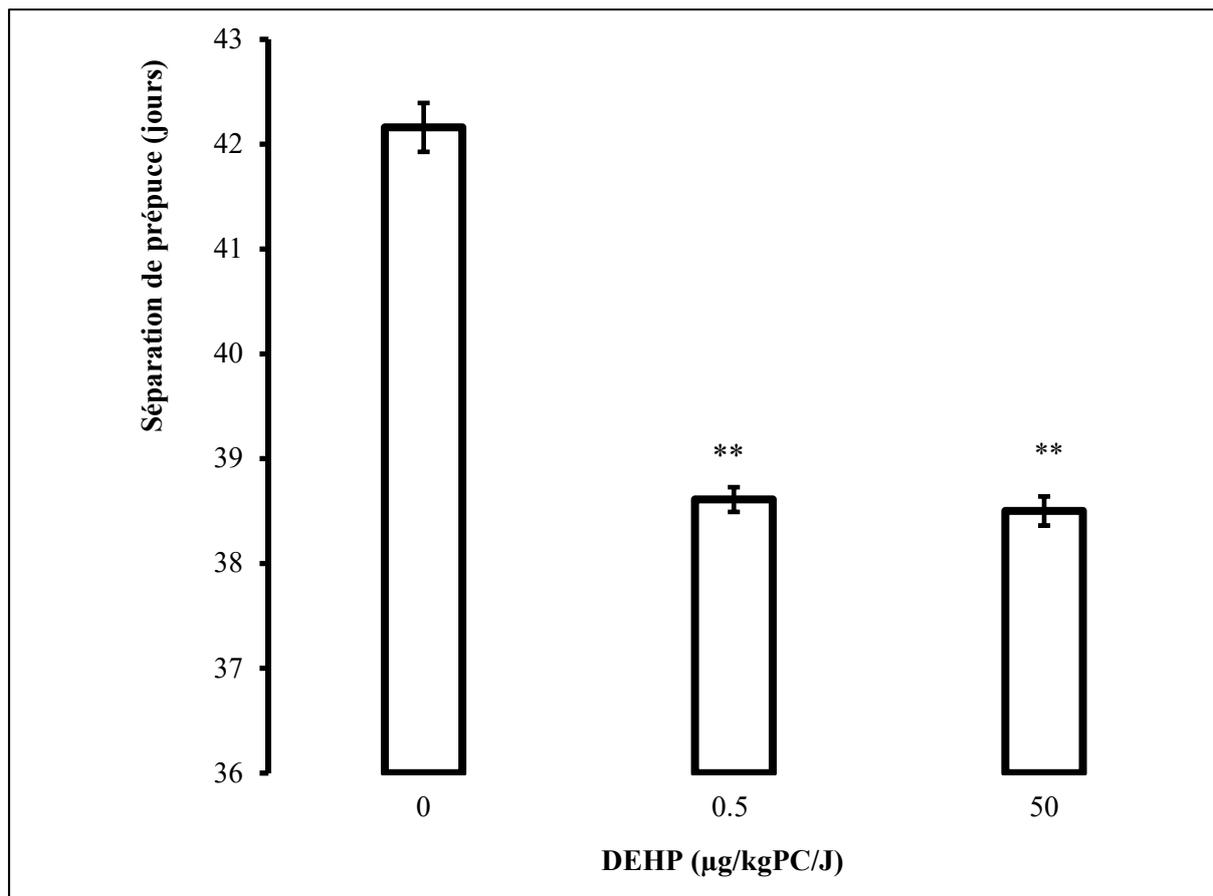


Figure 6.7: Effets du DEHP sur la progression de la séparation de prépuce (puberté) chez la descendance F1.

6.2. Résultats de la mise au point et validation d'une méthodologie analytique pour le dosage du DEHP

6.2.1. Optimisation des conditions chromatographiques

6.2.1.1. Longueur d'onde

L'analyse du spectre d'absorption UV du DEHP a montré la présence de deux maximums d'absorptions à $\lambda_{\text{max}} \approx 225\text{nm}$ et $\lambda_{\text{max}} \approx 276\text{nm}$, ce qui est conforme au spectre UV de référence du DEHP reporté dans le répertoire UV and IR Spectra Pharmaceutical Substances (2002). Les deux maximums d'absorptions observés sont utilisés dans toutes les analyses.

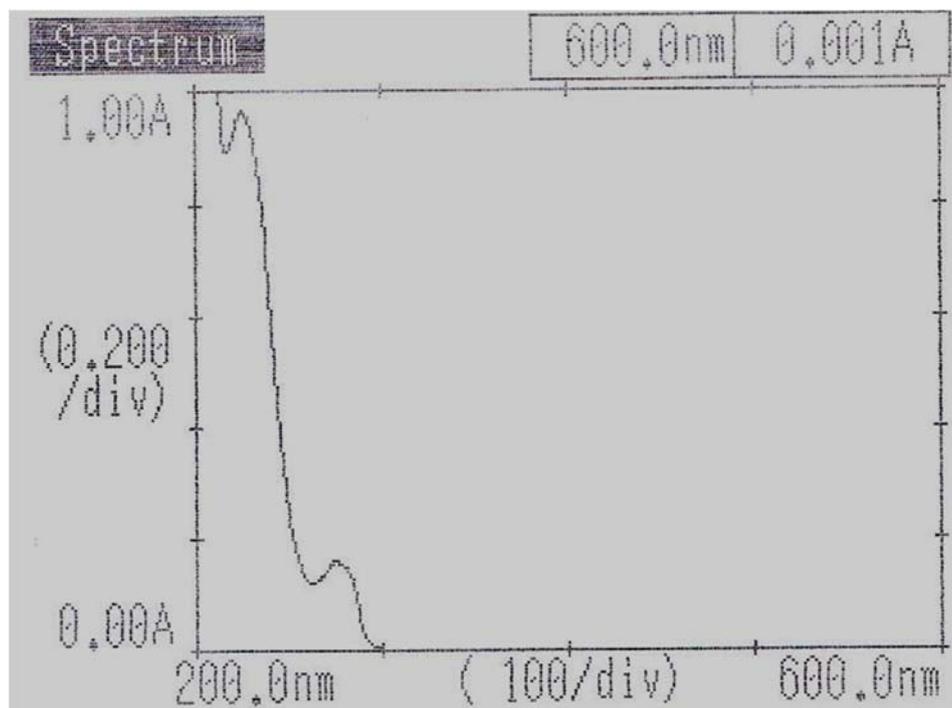


Figure 6.8: Spectre UV du DEHP dans le méthanol.

6.2.1.2. Phase stationnaire: une colonne Nucleosil 100 C18, d'une longueur de 250mm et un diamètre de 4.0 mm, avec une granulométrie de $5\mu\text{m}$ a été choisie en se référant à la littérature.

6.2.1.3. Phase mobile et débit: les résultats obtenus par les deux phases mobiles et débits testés sont présentés dans le tableau suivant et sur la figure 6.9.

Tableau 6.7: Valeurs chromatographiques obtenues en fonction des phases mobiles et débits testés

Phase mobile	Débit	Longueur d'onde	Temps de rétention (min)	Facteur de symétrie	Efficacité N
Acétonitrile/ eau 70/30 (v/v)	1ml/mn	225nm	25mn	/	/
	1ml/mn	276nm	25mn		
Acétonitrile 100%	1ml/mn	225nm	7.12	1.09	13425
		276nm	7.12	1.11	13457
	0.6ml/mn	225nm	12.17	1.07	21997
		276nm	12.17	1.06	21959

Comme le montre le tableau ci-dessus, la combinaison phase mobile constituée de l'Acétonitrile 100% et débit de 0.6ml/mn a donné une meilleure efficacité et un meilleur facteur de symétrie avec un temps de rétention 12.17 mn, par conséquent elle a été retenue pour la suite de l'étude.

A partir des différents résultats de l'optimisation nous avons fixé les conditions opératoires suivantes:

Tableau 6.8: Conditions chromatographiques optimisées

Colonne	C18 (250mm x 4.0 mm; 5 μ m)
Phase mobile	Acétonitrile 100%
Débit	0.6ml/mn
Longueurs d'ondes	225 et 276nm
Volume d'injection	50 μ l
Type d'élution	Isocratique
Temps d'analyse	20mn

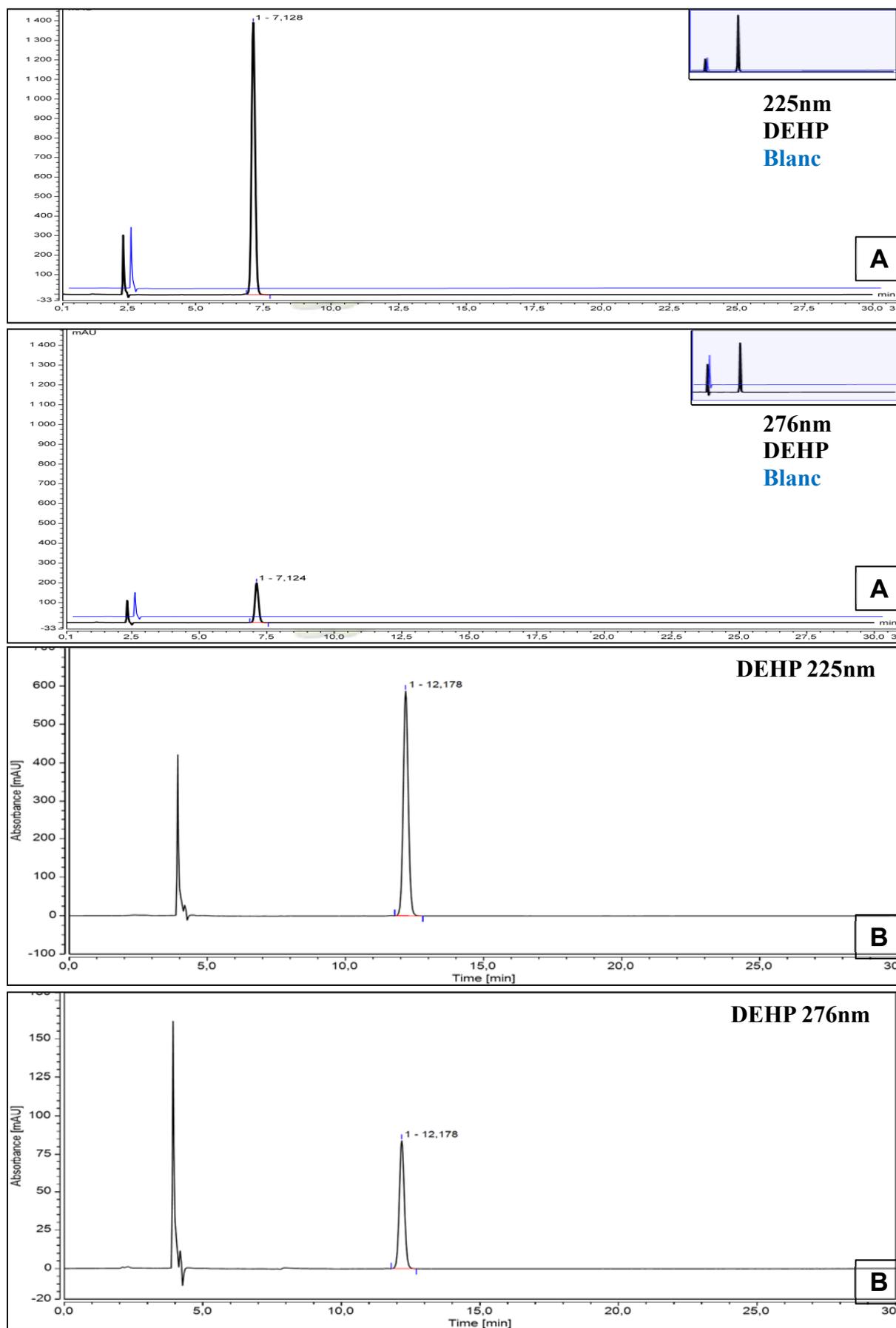


Figure 6.9: Profils chromatographiques du DEHP avec la phase mobile Acétonitrile 100% à 225nm et 276 nm. A: débit 1ml/mn, B: débit 0.6ml/mn.

6.2.2. Essais de validation de la méthode HPLC-UV

Les résultats de la validation dans la gamme d'étalonnage comprise entre 10 et 100µg/l ont montré une mauvaise linéarité dans tous les essais effectués et sur les deux longueurs d'ondes suivis, comme le montre le tableau 6.9 à 225nm. Pour voir si ce résultat est lié à l'appareil, les mêmes essais ont été repris sur l'HPLC-UV "waters", mais ils ont donné le même résultat dans tous les essais. Egalement, d'autres essais pratiqués à des concentrations plus élevées allant jusqu'à 450µg/l dans de l'eau ultra pure ainsi que dans de méthanol n'ont par résolu le problème. Nous avons donc conclu que la méthode n'est pas valide dans ce domaine de faibles concentrations en raison de mauvaise linéarité.

Tableau 6.9: Résultats des essais de validation dans le domaine de 10 à 100µg/l à 225nm

Concentrations (µg/l)	Surface (mAU*mn) à 225 nm				
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
10	0,081309569	0,79087194	1,77885487	0,06076361	0,073
10	0,072	0,79727365	1,71204827	0,07473829	0,075
10	0,08344328	0,79190541	1,68721837	0,07373829	0,075
20	0,130771495	0,424	0,922	0,162	0,105
20	0,131	0,424	0,93193741	0,167	0,108
20	0,138	0,42970397	1,02491856	0,17414248	0,112
40	0,231	0,87816798	1,88086113	0,234	0,12471389
40	0,2220729	0,868	1,92329492	0,23192293	0,12143138
40	0,230572597	0,888	1,89788697	0,24039277	0,12
50	0,17	0,1103236	0,94280654	0,08566356	0,14353847
50	0,173053319	0,10557986	0,96936058	0,086	0,148
50	0,169458704	0,10557986	0,95190278	0,086	0,157
100	0,352660936	0,63	1,03561113	0,265	0,17385206
100	0,352307541	0,642	1,03888725	0,261	0,16718788
100	0,352660936	0,63722932	1,026	0,26488802	0,17045232
R ²	0.906	0.01	0.157	0.452	0.850
Pente	0.002	(- 0.000)	(-0.005)	0.001	0.001
Ordonnée à l'origine	0.067	0.607	1.544	0.093	0.081
Recouvrement (%)	134,5884389	/	/	130,707908	79,8288244
RSD	52,25458546	/	/	240,125922	78,8680853
SE	0,028315612	/	/	0,05835415	0,01245393
SD	0,012663511	/	/	0,02609756	0,00556974
LOD (µg/l)	20,89479393	/	/	86,1219575	18,3801272
LOQ (µg/l)	63,31755737	/	/	260,975629	55,6973551

Par contre en changeant le domaine de concentrations en passant à des concentrations plus élevées allant de 500 jusqu'à 2000 $\mu\text{g/l}$, nous avons obtenu une très bonne linéarité à partir de 900 $\mu\text{g/l}$ avec un R^2 de 0.999 sur les deux longueurs d'ondes 225 et 276 nm comme le montre la figure suivante.

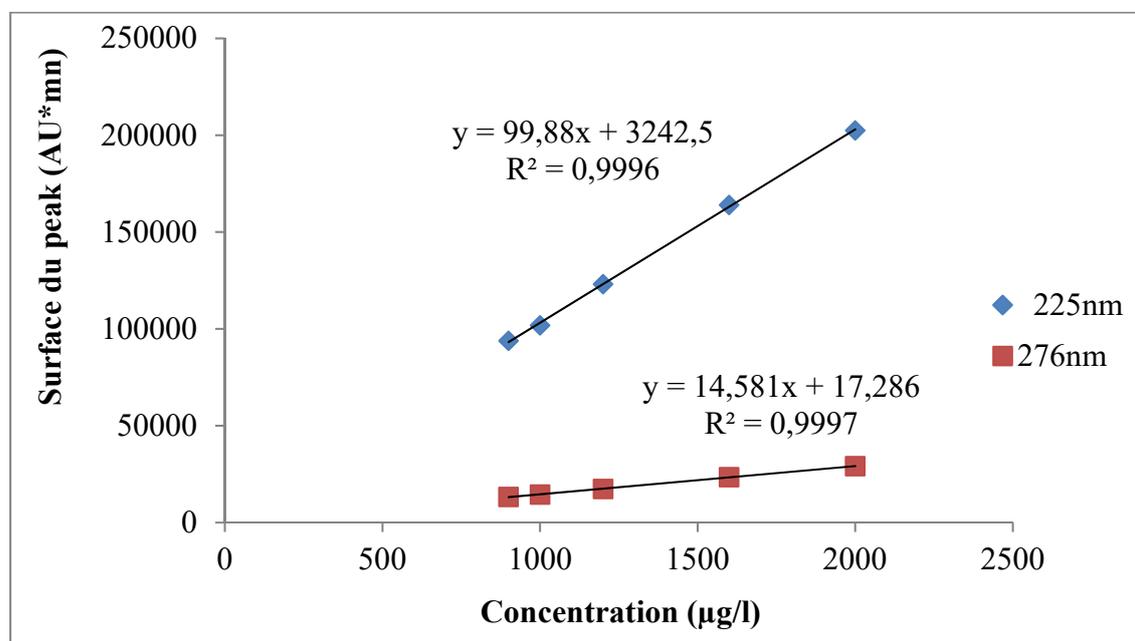


Figure 6.10: Droites d'étalonnage du DEHP entre 900 et 2000 $\mu\text{g/l}$ sur les deux longueurs d'ondes 225 et 276nm.

Egalement une très bonne valeur de recouvrement égale à 99.99% avec un RSD de 0.82 ont été obtenus, les limites de détection et de quantification sont de l'ordre de 23.75 et 71.97 $\mu\text{g/l}$ respectivement à 225nm. Le tableau suivant résume les différents paramètres et résultats de la méthode.

Tableau 6.10: Paramètres de validation dans le domaine 900-2000 $\mu\text{g/l}$

Paramètres de la méthode	225 nm	276nm
Exactitude "recouvrement" %	99.99 \pm 0.82	100.01 \pm 0.73
Pente "a"	99.88	14.58
Ordonnée à l'origine "b"	3242	17.28
Range de linéarité	900 - 2000 $\mu\text{g/l}$	900 - 2000 $\mu\text{g/l}$
Coefficient de corrélation R^2	0.999	0.999
SE	1607.433	215.244
SD	718.888	96.263
LOD $\mu\text{g/l}$	23.751	21.787
LOQ $\mu\text{g/l}$	71.975	66.024

6.2.2.1. Spécificité : La spécificité de la méthode a été évaluée en vérifiant la capacité de la méthode à séparer les différents phtalates DEHP, DBP, DIBP et DOTP. Comme le montre les chromatogrammes de la figure 6.11, le temps de rétention du DEHP est très différent de celui des autres phtalates. Donc la méthode est très spécifique et peut séparer les différents phtalates;

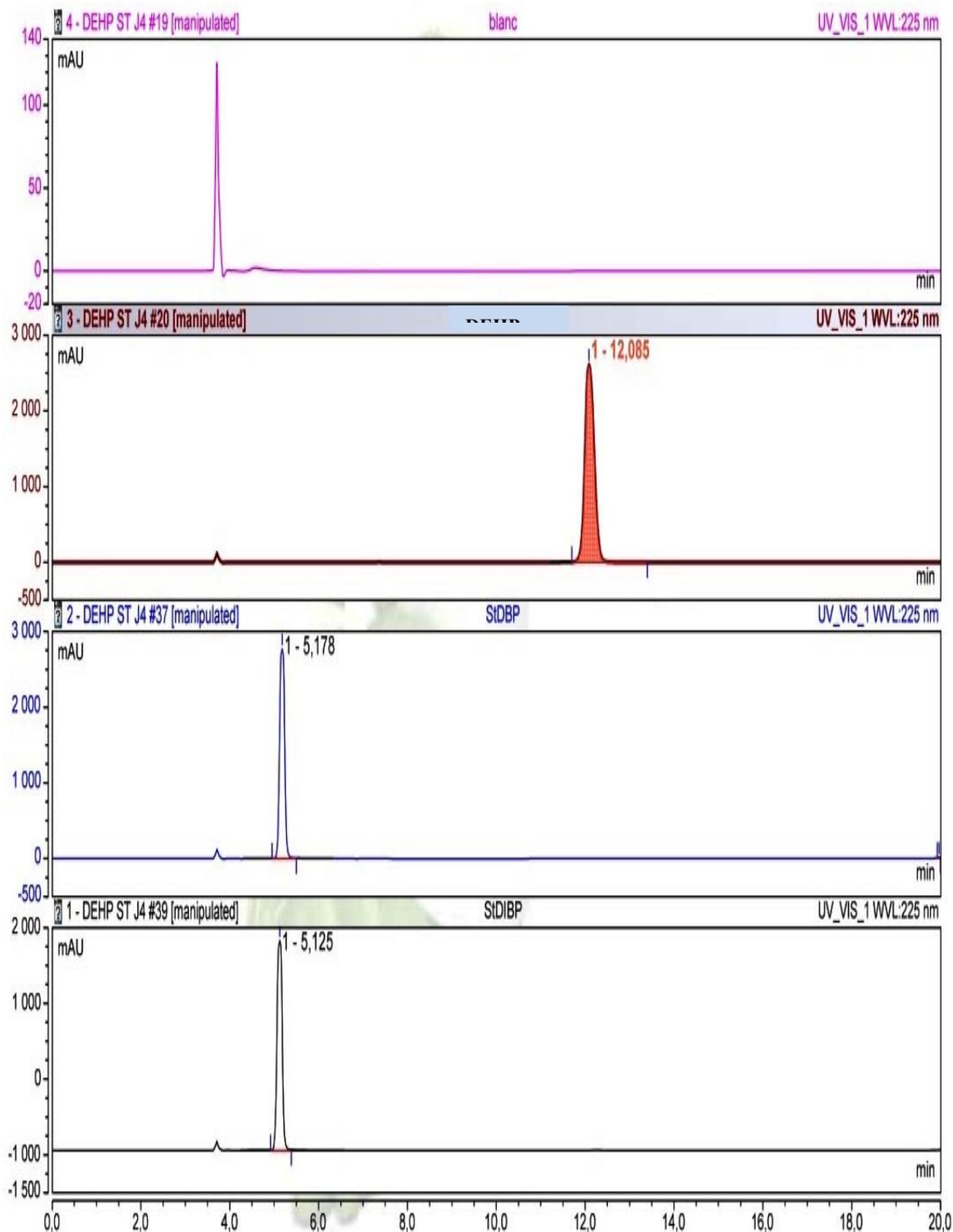


Figure 6.11: Chromatogrammes du blanc, DEHP, DBP et DIBP à 225nm.

6.2.3. Rendements de préconcentration

Le tableau suivant présente les valeurs des rendements avec les écarts types obtenus par les deux techniques de préconcentration testées. Les valeurs sont calculées après soustraction de la surface du blanc négatif des surfaces des blancs positifs.

Tableau 6.11: Rendements de préconcentration par SPE et lyophilisation

	Rendement (%)	
	225nm	276nm
SPE	70 ± 0.9	70 ± 1.00
Lyophilisation	145 ± 43.47	145 ± 43.47

Comme le montre le tableau, les rendements des deux techniques sont différents, SPE donne 70 % qui est considérée comme acceptable. La lyophilisation donne un rendement qui dépasse 100% (145%), ce qui est due aux contaminations externes par le DEHP qui a été détecté même dans le blanc d'eau ultra pure lyophilisé.

6.2.4. Dosage du DEHP dans les échantillons d'eau minérale embouteillée

Le DEHP n'a pas été détecté dans tous les échantillons d'eau analysés soit sans extraction ou après extraction SPE. Par contre il a été détecté dans tous les échantillons analysés après lyophilisation y compris les blancs, ce qui signifie que les résultats ne sont pas concluants en raisons des contaminations importantes. Les résultats de dosage sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 6.12: Résultats de dosage du DEHP dans l'eau minérale embouteillée par HPLC-UV.

Echantillons	Lyophilisation		SPE		Sans extraction	
	225nm	276nm	225nm	276nm	225nm	276nm
Echantillon 1(µg/l)	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Echantillon 1(µg/l)	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Echantillon 1(µg/l)	2406,23	2406,90	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Echantillon 1(µg/l)	1409,79	1414,79	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Echantillon 1(µg/l)	1040,26	1045,79	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Echantillon 1(µg/l)	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Blanc 1 (µg/l)	2401,02	2392,09	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Blanc 2 (µg/l)	1170,43	1166,23	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

6.2.5. Résultats des blancs

Plusieurs blancs ont été fait durant toute la procédure analytique, aucun pic au temps de rétention du DEHP n'a été détecté dans tous les blancs fait au niveau de laboratoire WANYLAB; le blanc de la verrerie, de la paillasse, air de laboratoire, l'eau ultra pure et des solvants, à l'exception du blanc des préparations de 2^{ème} jours des essais de validation (figure 6.9), qui semble être due à une contamination par un produit alimentaire emballé dans du plastique dont le contrôle se faisait sur la même paillasse!.

Egalement les blancs des solvants d'extraction SPE (méthanol, acétonitrile), blanc matrice (eau ultra pure) ainsi que les blancs des cartouches SPE et le blanc de la paillasse d'extraction SPE réalisés au centre de bioéquivalence de Sidal, n'ont pas présenté de pic au temps de rétention du DEHP et aucun autre pic de contaminants. Par contre, une forte contamination traduite par des pics au temps de rétention du DEHP, à été observée dans les blancs (eau ultra pure) lyophilisés au CRNA. Des petits pics au temps de rétention du DEHP ont été également détectés dans les blancs réalisés au service pharmacotoxicologie LNCPP, particulièrement après un certain temps d'ouverture des flacons dans la salle de manipulation. Les différents résultats des blancs sont présentés dans le tableau suivant;

Tableau 6.13: Résultats des blancs réalisés au cours de la procédure analytique

Blancs	Lieu de réalisation			
	WanyLab	LNCPP	CRNA	CB Sidal
Solvants (Méthanol, Acétonitrile)	<LOD	<LOQ	/	<LOD
Eau ultra pure	<LOD	<LOQ	/	<LOD
Eau ultra pure lyophilisée	/	/	1785,72 µg/l	/
Verrerie	<LOD	<LOQ	/	/
Cartouches SPE	/	/	/	<LOD
Air de laboratoire	<LOD	<LOQ	/	<LOD

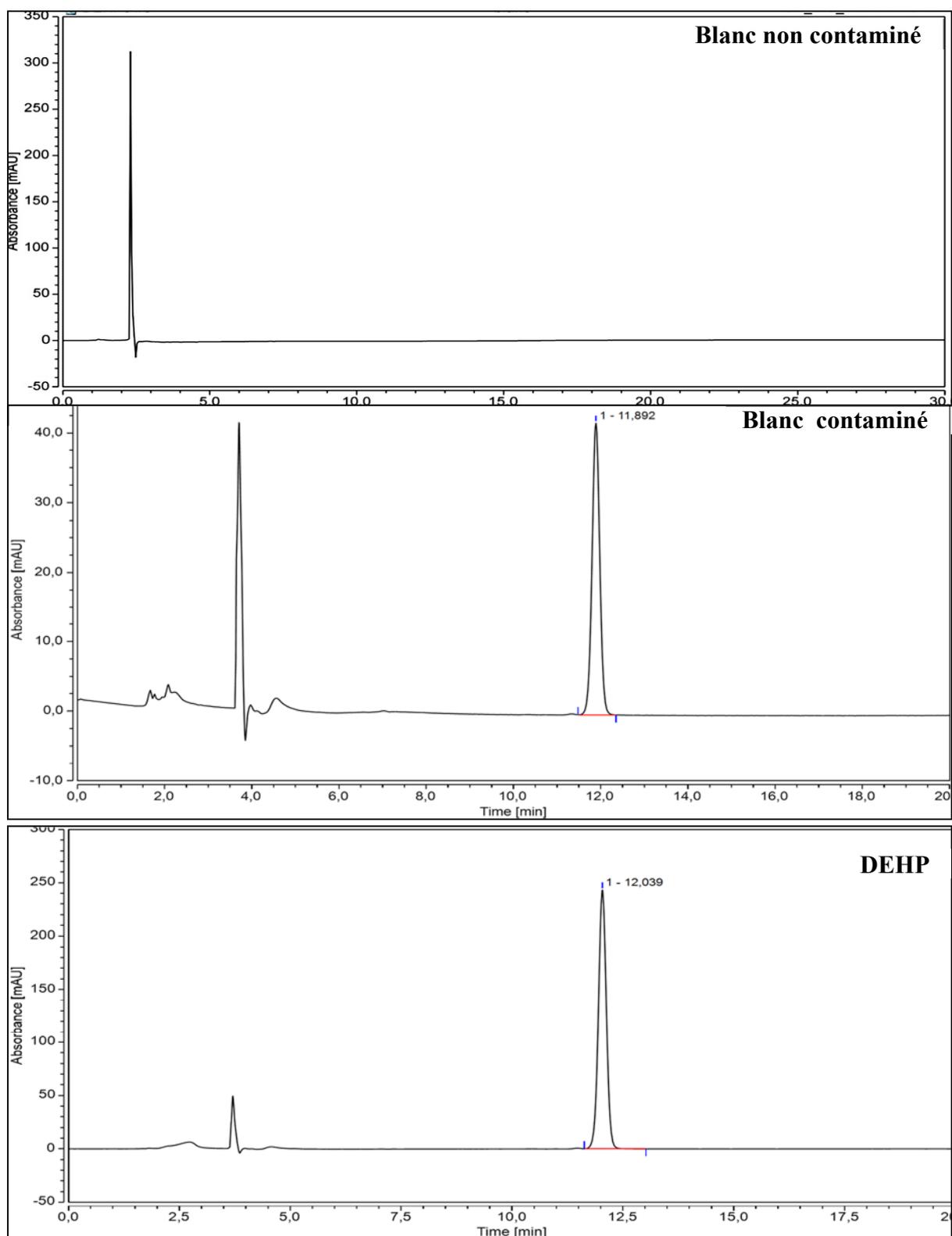


Figure 6.12: Chromatogrammes d'un blanc exempt du DEHP et d'un blanc contaminé qui présente un pic important au temps de rétention du DEHP.

CHAPITRE 7

DISCUSSION

Durant ces dernières années l'apparition du concept des "perturbateurs endocriniens" a soulevé deux grandes hypothèses; 1) "effets à faibles doses" qui stipule que les perturbateurs endocriniens peuvent avoir des effets toxiques aux doses environnementales (très faibles doses largement inférieures aux limites réglementaires), particulièrement pendant les périodes sensibles de développement, ce qui remet en cause le paradigme classique de la toxicologie fondamentale qui stipule que la "dose fait le poison" et par conséquent tout le système réglementaire à l'origine de la gestion des produits chimiques; 2) "Origine développementale de la santé et des maladies", qui stipule que l'exposition aux facteurs environnementaux durant les "périodes sensibles" de développement, particulièrement la période fœtale "*in utero*", période néonatale, pré-pubertaire et la période pubertaire, peut affecter non seulement l'individu exposé, mais également les descendances ainsi que les générations suivantes.

Le DEHP est l'un des perturbateurs endocriniens le plus préoccupant en raison de son omniprésence dans l'environnement et la multiplicité des sources d'exposition. L'évaluation de ses effets trans-générationnels aux doses environnementales "faibles doses", sur le système de reproduction chez le rat Wistar était le premier objectif de cette présente thèse. Les principaux paramètres reproductifs évalués sont les suivants: concentration spermatique, testostérone, puberté, fertilité, DAG et histopathologie des organes reproducteurs.

A notre connaissance, cette présente étude est la première qui étudie les effets trans-générationnels à faibles doses du DEHP sur le système reproducteur.

Le premier résultat alarmant que nous avons observé est l'infertilité des rats F0 exposés à 5000 μ g/kg/j. En effet, l'exposition de la génération paternelle F0 aux faibles doses du DEHP, durant la période pré-pubertaire, pubertaire et post-pubertaire a réduit l'indice de fertilité de 90% (presque la totalité) et 56% à 5000 et 50 μ g/kgPC/j du DEHP, respectivement, (18/20 et 11/19 mâles ont été infertiles à 5000 et 50 μ g/kgPC/J, respectivement) (tableau 6.1). Cependant cet effet n'a pas été transmis à la génération F1, exposée *in utero*/lactation ainsi que via l'exposition directe de son génome paternel. Dans la littérature, à notre connaissance, il n'y a aucune étude sur les effets d'une exposition post-natale (de sevrage à l'âge adulte) au DEHP sur la fertilité. Par ailleurs, un résultat similaire a été rapporté à fortes doses du DBP chez la génération paternelle F0 exposée de sevrage à l'âge adulte [205, 206]. Dans ces études,

l'exposition à 1000mg/kg/j et 500mg/kg/j du DBP a donné des infertilités de 100% et 37% , respectivement. Par ailleurs, des infertilités totales ont été rapportées chez la génération F1 exposée *in utero* et continuellement de sevrage à l'âge adulte à 1000 et 9000 ppm du DEHP, dans les études multi-générationnelles de WOLFE et LAYTON [117] ainsi que l'étude conduite par le leader mondial de la production du DEHP, BASF [207]. Tandis qu'aucun effet sur la fertilité n'a été rapporté chez la génération F1 exposée *in utero*/lactation à faibles comme à fortes doses du DEHP [150], similairement à nos résultats. Cela suggère que le mécanisme d'action du DEHP sur la fertilité n'est pas trans-générationnel, mais il n'est pas identifié jusqu'a présent. Ces infertilités pourraient être dues à l'exposition au DEHP pendant la puberté, en effet certains auteurs ont indiqué que l'exposition aux facteurs environnementaux durant la puberté, pendant laquelle se déroule la spermatogenèse dans le testicule et la maturation de spermatozoïdes (pour les rendre fertiles) dans l'épididyme peut affecter la fertilité à l'âge adulte [80, 81]. En outre, GRAY et al.[205] et WOLF et al.[206] ,ont indiqué que l'infertilité pourrait être due à l'atrophie testiculaire et la réduction de la concentration spermatique. D'ailleurs ce fait a été confirmé par nos résultats qui ont montré que cette dernière (concentration spermatique) est fortement affectée chez les deux générations parentales paternelles. En effet, la concentration spermatique a connue une réduction de 46, 24 et 41% à 5000, 50 et 0.5 µg/kg PC/j respectivement? chez la génération F0 et une réduction de 47% avec un cas (1/10) d'azoospermie, et 38% à 50 µg/kg PC/j et 0.5 µg/kg PC/j, respectivement, chez la génération F1. Parallèlement, l'examen histopathologique des épидидymes des rats de F0 et F1 a révélé des oligospermies modérées et sévères dans tous les groupes traités mais elles étaient plus prononcées chez les rats F1 dont nous avons observé un cas d'azoospermie. Plusieurs agglutinations ont été également observé dans les épидидymes des deux générations F0 et F1. Dans le testicules des rats de la génération F0, une dégénérescence vacuolaire a été observée à 0.5 µg/kg PC/j et une absence totale des spermatozoïdes dans certains tubes séminifères des rats exposés à 50 µg/kg PC/j, avec altération de toute la lignée germinale dans d'autres tubes (figure 6.4). Les lésions testiculaires ont été plus prononcées chez la génération F1, qui a montré une dégénérescence cellulaire et vacuolaire avec altération de la lignée germinale et une azoospermie dans certains cas exposés à 50µg/kgPC/j (considéré comme une DJT) (figure 6.6).

Les résultats observés chez la génération F0 sont similaires à ceux observés à fortes doses du DEHP (de 250 à 2000 mg/kg PC/j) chez le rat adulte exposé pendant 10 à 15 jours uniquement [139, 140, 208], ainsi qu'à faibles doses (5,20 et 40 µg/kgPC/j) durant la période

néonatale où les auteurs ont rapporté une réduction de la concentration spermatique près de 50% chez la souris [167]. Cependant, l'exposition durant la période post-pubertaire (du 42^{ème} JPN au 105^{ème} JPN) aux faibles doses du DEHP, 30, 100, 300, et 1000 µg/kg PC/j, est sans aucun effet sur la concentration spermatique chez le rat [209]. Cela suggère que la période pré-pubertaire est très sensible et détermine la concentration spermatique de l'adulte. En effet, cette période est caractérisée par la prolifération des cellules de Sertoli qui déterminent la production spermatique [7, 10]. Ce fait, est appuyé par nos résultats de comptage de cellules de Sertoli qui ont révélé une diminution de 22 % et 42 % à 50 et 5000 µg/kg PC/j, respectivement, ainsi que par plusieurs auteurs qui ont étudié les effets d'exposition durant la période pré-pubertaire aux fortes doses du DEHP sur le nombre des cellules de Sertoli et la concentration spermatique [10, 70, 210]. Cependant, la dose 0.5 µg/kg PC/j, qui est une dose cent fois inférieure à la DJT, semble être sans effet sur le nombre de cellules de Sertoli, malgré la réduction de la concentration spermatique. Cela pourrait être due au fait que le DEHP interfère et agit avec une multitude de mécanismes d'action différents mécanismes d'action en fonction de la dose, comme indiqué par SCHUG et al. [51] et LYCHE et al. [131]. Selon ZHANG et al. [167], la réduction de la concentration spermatique après une exposition à faibles doses du DEHP est due la diminution de l'expression des gènes DDx3Y, Usp9Y, RBM, E1F1AY, EGF, FSHR et EGFR impliqués dans la production spermatique. Par contre, PARMAR et al. [139] ont évoqué un mécanisme d'action enzymatique via l'altération de l'activité des enzymes responsables de la maturation des spermatozoïdes. Cette approche semble être en accord avec nos résultats de l'examen histopathologique des testicules qui a révélé un problème de maturation des spermatides en spermatozoïdes. Selon HOLSON et al. [211], une réduction de la concentration de spermatozoïdes en présence d'un nombre normale de spermatides implique que le processus de maturation est affecté. Similairement, DOSTAL et al. [70] ont rapporté une diminution de la maturation des spermatides en dose-dépendante, après six semaines d'exposition au 10, 100, 1000 et 2000 mg/kg/j du DEHP chez le rat.

La concentration spermatique chez la génération F1 exposée uniquement in utero/lactation et via l'exposition de son génome paternel, a également connue une baisse importante, comme l'ont bien montré nos résultats (figure 6.1). Ces derniers sont en accord avec ceux rapportés par les études trans-générationnelles réalisées à fortes doses du DEHP et en suivant le protocole d'exposition in utero/lactation. En effet, CHEN et al. [158] et GRAY et al. [160] ont rapporté une diminution significative de la concentration spermatique à 300 et 750 mg/kg PC/j du DEHP chez la génération F1. De leur côté, DOYLE et al. [159] ont rapporté une diminution de près de 50% non seulement chez la génération F1, mais également

chez les générations F2, F3 et F4. En outre, plusieurs autres auteurs ont rapporté une diminution de 50 à 70% de la concentration de spermatozoïdes chez le rat et souris adulte exposé *in utero* à faibles et à fortes doses du DEHP de l'ordre de 45, 50, 1215 $\mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{j}$, et 5, 100 et 500 $\text{mg}/\text{kgPC}/\text{j}$ [150, 155, 163, 164].

Tous ces résultats et données suggèrent que les effets du DEHP sur la concentration spermatique sont trans-générationnels, et confirment les deux l'hypothèses de départ "Origine développementale de la santé et des maladies" et "effets à faibles doses". Cependant, le mécanisme d'action reste toujours inconnu et non élucidé. Par ailleurs, nos résultats ont démontré que la dose réglementaire DJT (50 $\mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{j}$) considérée comme dose "sans risque" est en fin de compte une dose à grand risque qui diminue la concentration spermatique d'environ 50% avec des lésions histologiques importantes même chez la deuxième génération exposée uniquement via l'exposition maternelle et paternelle. De plus, la plus faible dose environnementale d'exposition humaine (0.5 $\mu\text{g}/\text{kg PC}/\text{j}$) qui est cent fois inférieur à la DJT, a également diminué significativement la concentration spermatique avec des lésions histologique sur deux générations F0 et F1. Cela impliquerait que les doses environnementales auxquelles nous sommes tous exposés quotidiennement dans notre vie, ne sont pas sans risque pour les fonctions reproductives mâles et peut être l'Homme est vraiment en voie de disparition?!

Le niveau de la testostérone chez les deux générations paternelles F0 et F1 mesuré au 120^{ème} JPN, est un autre paramètre qui a été affecté par l'exposition au DEHP. En effet les résultats ont révélé une réponse non-monotonique avec une augmentation significative à 50 $\mu\text{g}/\text{kgPC}/\text{j}$, chez la génération F0. Tandis que chez la génération F1, le niveau de la testostérone a connu une diminution dose-dépendante de 38% et 20% à 50 et 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg PC}/\text{J}$, respectivement (figure 6.2).

A notre connaissance, cette présente étude est la première qui traite les effets à faibles doses du DEHP sur la testostérone durant la période post-natale de la génération F0. Cependant, cette non monotonie des réponses, appelée également "modèle bi-phasique" à faibles doses des perturbateurs endocriniens a été récemment décrite dans la littérature, en Mars 2012, VANDENBERG et al. [64] ont publié une synthèse sur les effets à faibles doses des perturbateurs endocriniens et la non monotonie des réponses, ils ont indiqué que les faibles doses des perturbateurs endocriniens donnent souvent des réponses non monotones sous forme de courbe en "U" inversé". En 2014, la même équipe de chercheurs [63] a indiqué les effets à faibles doses ainsi les réponses non monotones sont une réalité bien démontrée

pour les perturbateurs endocriniens, comme ils ont précisé que mécanisme d'action serait lié aux interactions récepteur-ligand. De quelle manière on le ne sait pas encore !!

Un similaire modèle bi-phasique a été rapporté par GE et al. [147] qui stipulent que l'exposition post-natale aux faibles doses du DEHP augmente le niveau de la testostérone, tandis que les fortes doses le diminue. Dans leur étude, ils ont exposé des rats en période pré-pubertaire, de 21^{ème} JPN au 48^{ème} JPN, à 10, 500 et 750 mg/kg PC/j, ils ont observé une augmentation significative de la testostérone qui est passé de 1.98 ± 0.20 ng/ml chez le groupe témoins à 3.13 ± 0.37 ng/ml chez le groupe traité par 10mg/kg, tandis que la dose de 750mg/kg le diminue jusqu'à 1.18 ± 0.18 ng /ml. Lorsque les même auteurs ont refait l'expérience *in vitro* sur les cellules de Leydig productrice de la testostérone, ils ont observé la même courbe de réponse; la dose de 27.8 µg/ml de MEHP avait un effet stimulateur sur la production de la testostérone tandis que la dose de 2780 µg/mL avait un effet inhibiteur. similairement AKINGBEMI et al. [135] ont rapporté une augmentation significative de la testostérone après une exposition post-natale de la période pré-pubertaire à la période post-pubertaire (de 21^{ème} JPN au 120^{ème} JPN) à 10 mg/kg et 100 mg/kg du DEHP chez le rat. Par contre à fortes doses (500, 750, 1000, 1250 mg/kgPC/d), tous les auteurs ont rapporté un effet monotone anti-androgénique du DEHP après l'exposition post-natale [134, 136, 138, 147, 208, 212, 213].

Concernant l'effet trans-générationnel des faibles doses du DEHP sur la testostérone chez la descendance mâle adulte, aucune étude ne les a abordé jusqu'à présent. Cependant, FIANDANESE et al. [164] et LEE et al. [115], similairement à nos résultats observés chez la génération F1, ont rapporté une diminution significative de la testostérone chez le rat adulte exposé *in utero* à 50 et 100mg du DEHP. Par contre, ANDRADE et al.[150] et GRAY et al. [160] n'ont observé aucun effet à faible (15µg/kg/j) et à fortes doses (300, 405 mg/kg/j) du DEHP chez le rat adulte exposé *in utero*.

La non monotonie des réponses observée à faibles doses du DEHP sur la sécrétion de la testostérone, est considérée par certains auteurs [67, 69] comme un facteur limitant qui freine la réglementation. Cependant, le principe de précaution doit normalement inciter les instances réglementaires de les prendre en considération.

Le mécanisme d'action du DEHP à faibles doses sur la testostérone reste jusqu'à présent inconnu, cependant selon nos résultats il semble être trans-générationnel et avec deux modes d'actions différents en fonction de la période d'exposition. Durant la période post-natale, l'augmentation observé à 50µg/kg/j chez la génération F0 pourrait être due à l'action du DEHP sur les cellules de Leydig qui ont connue une augmentation de 35%. Un similaire

mécanisme a été rapporté par AKINGBEMI et al. [135] à 10 et 100mg/kg du DEHP chez les rats exposés de 21^{ème} JPN au 100^{ème} JPN. Cependant, à la plus faible dose de 0.5µg/kg/j, le nombre des cellules de Leydig n'a pas été affecté malgré l'augmentation de niveau de la testostérone. Selon AKINGBEMI et al. [214], cela pourrait être due au mécanisme compensatoire!. Par contre à fortes doses, la majorité des auteurs évoquent un mécanisme enzymatique via l'inhibition de la synthèse de la testostérone ainsi que la dégénérescence des cellules de Leydig. [212-214].

Les effets observés chez les deux générations paternelles se sont bien transmis à leur descendance F1 et F2 évaluées durant toute la période de lactation jusqu'au sevrage. En effet, la DAG (qui est un dimorphisme sexuel utilisé comme marqueur très sensible d'exposition prénatale aux perturbateurs endocriniens, les anti-androgéniques en particulier, et un indice fiable de prédiction de la qualité de sperme ainsi que les facultés reproductrices de l'adulte) a montré une diminution importante en dose-dépendante chez les deux générations F1 et F2. Similairement SWAN et al. [54, 129] ont indiqué que la diminution de la DAG a été directement associée à l'exposition prénatale aux phtalates. En effet, toutes les études trans-générationnelles traitant l'effet du DEHP sur la DAG à faible (5µg/kg/j) et à fortes doses (300,500 et 750 mg) ont rapporté une diminution significative chez les générations F1 et F2 chez le rat ainsi que chez la souris [158-160, 215]. Parallèlement, SWAN et al. [129] ont rapporté une corrélation positive entre l'exposition au DEHP pendant le premier semestre de grossesse et la DAG chez les garçons nouveau nés, confirmant ainsi que l'exposition environnementale (doses environnementales) au DEHP pendant la grossesse affecte potentiellement le développement de l'appareil génital mâle des nouveaux nés et par conséquent leur santé reproductrice à l'âge adulte. Cela laisse supposer que la féminisation des mâles que nous observons de plus en plus dans le monde est probablement due aux perturbateurs endocriniens?

La puberté est également un autre paramètre qui a été potentiellement affecté par l'exposition au DEHP. En effet, nous avons observé une puberté précoce chez la génération F1 dont la séparation de prépuce a débuté au 38.61 ± 0.11 et 38.50 ± 0.13 jours à 0.5 et 50µg/kgPC/j, respectivement, contre 42.16 ± 0.23 jours chez le groupe contrôle. Cet effet pourrait être due à l'effet stimulateur du DEHP sur la synthèse de la testostérone pendant cette période de développement.

Les données rapportées dans la littérature scientifique sur l'impact des phtalates sur la puberté suggèrent un modèle bi-phasique qui stipule que les faibles doses accélèrent la puberté [135, 147], tandis que les fortes doses la retarde [160, 216]. ANDRADE et al. n'ont

observé aucun effet sur la puberté chez le rat exposé *in utero*/lactation à faibles et à fortes doses du DEHP [151]. Néanmoins, l'effet sur la puberté semble être trans-générationnel puisque DOLYE et al. [159] ont rapporté une puberté tardive sur plusieurs générations; F1, F2 et F3.

A ce jour, les mécanismes d'action du DEHP, à faibles comme à fortes doses, sur les différentes fonctions de système reproducteur mâle ainsi que les mécanismes expliquant l'origine développementale de la santé et des maladies sont mal connus. Cependant plusieurs auteurs ont évoqué le mécanisme épigénétique dans les effets trans-générationnels via la méthylation de l'ADN des cellules germinales (génomme mâle) dans le testicule durant la vie fœtale qui persisterait à l'âge adulte ainsi que sur plusieurs générations [30, 72, 73, 76, 77, 79, 115, 158, 159, 217]. D'autre part, plusieurs autres auteurs ont discuté l'exposition paternelle avant l'accouplement et le rôle de l'épigénome spermatique dans la transmission des effets de la génération parentale paternelle vers la descendance. Selon les auteurs, le sperme est un médiateur de transmission trans-générationnelle, ainsi l'exposition paternelle aux facteurs environnementaux avant l'accouplement, pendant la spermatogenèse dans le testicule ou pendant la maturation spermatozoïdes dans l'épididyme, peut affecter le génome mâle paternel qui transmettrait des effets à la lignée germinale des futures générations [80, 81]. Deux gènes ont été identifiés sur les spermatozoïdes seraient responsable des transmissions trans-générationnelles [72, 79]. Cependant d'autres études sont nécessaires pour bien élucider les mécanismes d'action du DEHP à différents niveaux de doses et durant différentes périodes d'exposition sur le système reproducteur males ainsi que la contribution de l'exposition paternelle à la transmission trans-générationnelle.

Globalement, l'ensemble de nos résultats toxicologiques a montré que le DEHP donne des infertilités mâles, réduit la concentration spermatique et perturbe la sécrétion de la testostérone, à de très faibles doses. Parallèlement, le DEHP vient d'être reconnu comme étant un perturbateur endocrinien pour l'Homme et classé comme étant une substance hautement préoccupante. D'une autre manière les effets perturbateurs endocriniens du DEHP aux doses environnementales viennent être officiellement reconnus par l'Union Européenne [121]. Par conséquence, la mise au point de méthodologies analytiques performantes pour la détection de cette substance dans les différentes matrices environnementales est considérée comme une problématique de santé publique de premier ordre. Cependant, cette tâche n'est pas une chose aisée, particulièrement en Algérie, en raison des contaminations environnementales importantes dues à l'omniprésence du DEHP dans l'environnement ainsi que sa présence à

l'état traces dans certaines matrices d'une part, et d'autre part le coût très élevé d'investissement dans les détecteurs les plus performants (détecteur de masse) les rend inaccessibles. A travers les travaux de cette présente thèse, nous avons essayé de faire le premier pas dans la mise au point d'une méthodologie analytique en se focalisant sur la préparation préalable de l'environnement et la maîtrise des bonnes pratiques spécifiques aux phtalates pour fournir aux laboratoires une procédure analytique simple pour la détection du DEHP. Notre choix s'est porté sur la technique HPLC-UV qui reste la plus disponible dans la plupart des laboratoires.

Les essais de validation dans le domaine de faibles concentrations allant de 10 à 100 µg/l, ont montré une mauvaise linéarité avec un mauvais recouvrement qui semble être due à la sensibilité de détecteur UV. Un résultat similaire a été observé par AL RAYES [194] à des concentrations de 3 à 15 µg/l du DEHP dans l'eau par la GC-FID. Par ailleurs, l'augmentation des concentrations de la gamme d'étalonnage à 900 µg/l jusqu'à 2000 µg/l a permis d'obtenir une excellente linéarité ($R^2 = 0.999$) avec un excellent recouvrement (99%).

Néanmoins la limite de détection qui est de 23 µg/l montre que la méthode ne peut pas s'appliquer à la détection des éléments en traces comme le DEHP dans l'eau, de la même façon la limite de quantification de 70 µg/l s'est montrée beaucoup plus supérieure à la limite réglementaire du DEHP dans l'eau qui est fixée à 8 µg/l [119], ce qui signifie que la méthode ne peut pas quantifier le DEHP dans l'eau. Comparativement aux données de la littérature, la limite de détection de notre méthode (23 µg/l) diverge beaucoup de celles rapportées par les auteurs qui ont utilisé la méthode HPLC-UV pour la détection du DEHP dans l'eau minérale embouteillée en PET. En effet, la plus grande limite de détection rapportée est de 3.8 µg/l [182], tandis que la plus faible est de 0.04 µg/l [183]. D'autres auteurs ont rapporté des valeurs de 0.1, 0.6, et 1.2 µg/l [171, 184-186].

Cette divergence pourrait être due à la performance du détecteur UV ou bien à la méthode de prétraitement. En effet l'étape de préconcentration est très déterminante, nos résultats ont montré que les rendements des deux techniques testées sont différents. La SPE a donné 70 % qui est considérée comme acceptable comparativement aux rendements rapportés par la littérature qui varient de 70% à 96% [94, 175, 186, 193, 195], et faible comparativement au rendement de 100%. Cela pourrait être due au grand volume de l'échantillon préconcentré et le DEHP serait élué par l'eau [177]. La lyophilisation quant à elle, a donné un rendement qui dépasse 100% (145%). Ce résultat semble être due aux contaminations externes par le DEHP qui a été détecté même dans le blanc d'eau ultra pure

lyophilisée, en effet le protocole de la lyophilisation était très lourd, long et favorise les contaminations en raison de nombre important de la verrerie impliquée (éprouvettes, ballons, boîtes de Pétri) et les joints en PVC de lyophilisateur qui attachent les ballons semble être également une source de contamination. En outre, la lyophilisation a été réalisée en sept (7) étapes: dépôt des échantillons d'eau les ballons, congélation, première lyophilisation dans un lyophilisateur à ballons, transvasement dans des boîtes de Pétri, re-congélation puis une deuxième lyophilisation dans un lyophilisateur à boîtes de Pétri, par la suite vient l'étape de reconstitution. Toutes ces étapes avec toutes la verrerie impliquée en plus de l'air de laboratoire, favorisent les contaminations et expliquent le rendement qui dépasse 100%. Dans la littérature, un résultat similaire a été rapporté par BISCARDI et al. [93] qui ont utilisé la lyophilisation pour concentrer le DEHP dans l'eau minérale.

L'analyse des échantillons d'eau minérale en PET après extraction SPE n'a pas détecté le DEHP dans tous les échantillons y compris les blancs. Cela pourrait s'expliquer par la limite de détection élevée de notre méthode ainsi que le rendement d'extraction SPE qui n'a pas dépassé 70%. Un résultat similaire a été rapporté par AL RAYES [194] qui n'a pas détecté le DEHP par GC/FID dans 65 échantillons d'eau minérale libanaise, même après l'exposition à 40°C pendant 20 jours. Tandis que l'analyse des mêmes échantillons après la préconcentration par lyophilisation a détecté le DEHP dans tous les échantillons y compris les blancs. Des valeurs de 1.04, 1.40 et 2.40 mg/l du DEHP ont été quantifiés dans 3 échantillons/6, et 2.4 et 1.17 mg/l du DEHP dans les blancs. Ces résultats, qui dépassent largement la limite réglementaire du DEHP dans l'eau (8µg/l) [119], ne sont pas concluants et ne reflètent pas les quantités réelles du DEHP dans les échantillons analysés en raison des contaminations importantes, témoignées par les valeurs des blancs qui dépassent également largement la limite maximale autorisée dans le blanc qui est de 80 ng/l, fixée par la norme ISO 18856 ainsi que les valeurs rapportés dans la littérature qui varient entre 90 à 1640 ng/l [169]. Par ailleurs, les essais inter laboratoires sur l'analyse des phtalates menés par l'INERIS en 2009 [172] ont constaté également la difficultés pour la plupart des laboratoires d'obtenir la valeur de blanc 80ng/l, fixée par la norme ISO 18856 et de fournir des résultats fiables. BISCARDI et al. [93] ont rapporté une concentration similaire (3,20 mg/L) du DEHP dans l'eau minérale après préconcentration par lyophilisation.

Dans la littérature, les concentrations du DEHP rapportés dans l'eau minérale embouteillée en PET sont très variables de 0.17 µg/l [192] jusqu'à 50 µg/l [196]. Bien que la plupart de ces concentrations sont inférieurs à la limite réglementaire fixée par l'OMS (8µg/l),

ils peuvent avoir des effets toxiques pour le système endocrinien, comme l'ont montré les résultats de notre étude toxicologique à faibles doses.

L'origine du DEHP dans l'eau embouteillée et son utilisation comme plastifiant dans PET est controversée et mal définie. Selon certains auteurs, le PET ne contient pas du DEHP comme plastifiant, et son origine dans l'eau est 100% environnementale [97, 173, 189, 195]. Paradoxalement, plusieurs autres auteurs ont indiqué que le PET contient du DEHP qui y migre vers l'eau [93-96]. 103 mg/kg du DEHP ont été rapportées dans les bouteilles en PET destinée au conditionnement de l'eau [218], et MONTUORI et al. [96] ont indiqué que la concentration des phtalates dans les eaux embouteillées en PET est 20 fois plus élevées que dans les mêmes eaux conditionnées dans des bouteilles en verre (3.52 µg/L dans l'eau en PET, contre 0.19 µg/l pour l'eau dans les bouteille en verre). D'autres études dans des conditions environnementales plus strictes sont nécessaires pour bien définir l'origine des phtalates dans l'eau en bouteille de PET. En effet, l'omniprésence du DEHP et les contaminations environnementales sont considérées comme la contrainte majeure et un enjeu primordial dans l'analyse des phtalates et la fiabilité des résultats. Afin de remédier à ce problème et réduire les contamination, une préparation préalable de l'environnement de laboratoire, au niveau de "WanyLab", en tenant compte des différentes sources de contamination, décontamination de toute la verrerie, (les procédures de décontamination sont expliqués dans le chapitre 5), et réalisation de plusieurs blancs ont été effectuées pendant toutes les étapes de l'installation de notre démarche analytique. Cette dernière a été validée par les résultats des différents blancs qui n'ont montré aucun pic et aucune détection de contaminants (tableau 6.12). A l'exception des blancs réalisées au deuxième jours des essais de validation, qui ont montré un pic important au temps de rétention du DEHP (figure 6.9), qui semble être due aux contaminations par les manipulations d'un produit alimentaire emballé dans du plastique dont le contrôle se faisait en même temps et sur la même paillasse. Cette contamination a attiré notre attention sur la nécessité de réserver une salle de manipulation unique pour l'analyse des phtalates. Par contre, les blancs réalisés au niveau de laboratoire pharmacotoxicologie "LNCCP" ont présenté tous des pics de contaminants au temps de rétention du DEHP, en raison de l'inadéquation de la salle de manipulation à l'analyse des phtalates. Néanmoins la limite de quantification de notre méthode ne nous a pas permis de le quantifier. De même les blancs réalisés au niveau de CRNA ont montré une quantité importante du DEHP avec une moyenne de 1.17 mg/l (tableau 6.12) en raison de nombre important de manipulations et la verrerie impliquée en plus de l'air de laboratoire qui est considéré comme source importante

de contamination. En effet, une quantité du DEHP de $3\mu\text{g}/\text{m}^3$ (une valeur 37 fois supérieure à la limite maximale, $0.08\ \mu\text{g}/\text{l}$, fixée par ISO) peut être introduite dans le blanc par l'air de laboratoire, et $560\ \text{ng}/\text{l}$ peuvent être introduite par la verrerie [95, 172]. Ces résultats mettent encore une fois l'accent sur l'importance de la maîtrise de l'environnement et du blanc analytique dans l'analyse des phtalates et la fiabilité des résultats. Cela suggère l'adoption des mesures d'organisation et des procédures de décontamination très strictes dans les laboratoires, en tenant compte des différentes sources de contaminations.

CONCLUSION

A travers le travail de cette présente thèse, nous avons démontré les effets à faibles doses du DEHP sur la fonction de reproduction mâle, et ce non seulement chez la génération parentale F0 exposée directement, mais également chez la descendance F1 et F2. Ce qui répond à notre première question de départ "Est ce que les doses environnementales du DEHP (qui sont largement inférieures aux limites réglementaires) aux quelles nous sommes exposés quotidiennement dans notre vie peuvent être toxiques pour le système de reproduction des générations exposées directement et celui de leurs descendances qui ne sont pas exposées d'une manière directe à cette substance?". En effet, l'exposition aux doses environnementales du DEHP, qui incluent les deux doses réglementaires DJT (50µg/kg) et NOAEL (5mg/kg) et la plus faible dose d'exposition humaine 0.5µg/kg qui est cent (100) inférieur à la DJT, a provoqué une baisse significative de la concentration spermatique qui atteint environ 50% chez les deux générations F0 et F1 avec un cas d'azoospermie dans la génération F1, oligospermies et lésions histologiques dans les testicules des deux générations F0 et F1. La transmission des effets trans-générationnels à la descendance mâle s'est traduite par une puberté précoce à la génération F1, ainsi que une baisse très significative de la DAG qui reflète féminisation des mâles et l'altération de la reproduction à l'âge adulte chez les deux générations F1 et F2.

Notre étude a également démontré l'impact de la période d'exposition sur les effets à faibles doses. En effet, l'exposition post-natale a provoqué des infertilités presque totales au doses réglementaires 50µg/Kg et 5mg/kg avec une réduction significative de la taille des portées, tandis que ces effets n'ont pas été observés chez la génération F1 exposée *in utero*/lactation. De même, l'effet sur la testostérone s'est traduit par des réponses non monotoniques avec une courbe doses-réponses sous forme d'un "U" inversé après l'exposition post-natale de la génération F0, tandis que l'exposition *in utero*/lactation n'a pas affecté significativement la sécrétion de la testostérone chez la génération parentale F1 ainsi que chez la descendance immature F1 et F2.

Les résultats de travail de cette thèse nous permettent également de répondre à notre deuxième question de départ, "Est ce que les limites réglementaires du DEHP, basées sur les études toxicologiques à fortes doses nous protègent-elles réellement?". En effet, nos résultats ont démontré que la dose journalière tolérable du DEHP, fixée par les autorités réglementaires pour protéger le consommateur n'est pas sans risque et entraîne des effets toxiques significatifs et trans-générationnels sur la fonction de reproduction. Ces derniers ont été

observés même à une dose cent fois inférieure à cette dose journalière tolérable. Ainsi ce concept de DJT ou dose sans risque ne doit pas exister pour le DEHP.

Sur le plan analytique, ce travail de thèse nous a permis de faire le premier pas dans le développement d'une démarche analytique alternative pour le dosage du DEHP dans l'eau minérale embouteillée par HPLC-UV, en se focalisant sur la maîtrise des contaminations environnementales. Les résultats des blancs analytiques réalisés pendant toute la procédure analytique et dans plusieurs environnements différents ont mis en évidence l'impact de ce dernier sur la fiabilité des résultats et ont montré la nécessité d'adoption, par les laboratoires, des mesures d'organisations strictes nécessaires pour le dosage des phtalates ou des contaminants omniprésents dans l'environnement en général, comme par exemple réserver une salle de préparation spécifique à ce genres de contaminants et sensibiliser le personnel aux différentes sources de contamination.

Les essais de validation ont montré que la méthode alternative HPLC-UV ne peut pas s'appliquer au dosage des traces du DEHP dans l'eau en raison de la limite de détection qui s'est montré élevée (23 μ g/l) et supérieur à la limite réglementaire du DEHP dans l'eau. Ce qui signifie qu'il faut absolument aller vers le détecteur de masse qui reste jusqu'a présent le plus performant pour la détection des éléments en trace. Cependant la méthode HPLC-UV reste valable dans les matrices chargées en DEHP.

Concernant les techniques de préconcentration, la SPE a montré un rendement acceptable (70%) et elle consomme une faible quantité de solvants par conséquence elle minimise les contaminations. Cependant les différentes étapes sont réalisés manuellement et le dispositif n'est pas pratique pour les grands volumes ni pour un nombre important d'échantillons, mais c'est une technique qui s'automatise et actuellement plusieurs dispositifs SPE automates sont commercialisés. Le protocole de la lyophilisation est très lourd pour les grands volumes et pour un nombre important d'échantillons, il consomme beaucoup de temps et favorise les contaminations. Cependant c'est une méthode qui conserve la matière et peut très bien appliqué si on maîtrise les contaminations environnementales.

APPNCIDE A

Liste des symboles

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

CIRC: Centre International de Recherche sur le Cancer

CLP: Classification, Labelling and Packaging

CMR : Cancérogènes, Mutagènes et toxiques pour la Reproduction

DEHP : Di-(2-ethylhexyl)phthalate

DJT : Dose Journalière Tolérable

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

ISO : International Standardisation Organization

LMS: Limite de Migration Spécifique

LOAEL: Lowest Observable Adverse Effect Level

NOAEL : No Observable Adverse Effect Level

OCDE: Organisation de coopération et de développement économiques.

OFEV: Office fédéral de l'environnement

OFSP: Office fédéral de la santé publique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PC : Poids corporel

PVC: Polychlorure de Vinyle.

REACH: Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals

RSE: Réseau environnement santé

UE : Union Européenne

CRNA: Centre de Recherche nucléaire

NICNAS: National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme

JPN: jour post natal

APPENDICE B

QUELQUES CONSEILS PRATIQUES POUR DIMINUER L'EXPOSITION AUX PHTALATES

Que peut-on faire et tant que consommateur pour diminuer l'exposition aux phtalates ?

Dans l'absence totale d'une réglementation nationale relative aux phtalates, le consommateur reste le seul qui dispose du pouvoir de se protéger de ces substances dangereuses et ce, en prenant conscience des risques et en adoptant quelques pratiques saines dans le quotidien, particulièrement pour les femmes enceintes et les enfants.

Alimentation (source principale d'exposition)

- Avant tout, nous devons apprendre à se poser la question sur ce que nous mangeons et prendre conscience que notre santé est dans nos assiettes;
- Eliminer dans la mesure du possible le plastique dans la cuisine, le remplacer par le bois, le verre ou l'inox, particulièrement les poêles et casseroles antiadhésives ;
- Ne jamais mettre de la nourriture chaude dans du plastique;
- Eviter de cuisiner dans les sachets de cuisson en plastique (ils sont à 40% de phtalates);
- Eviter de réchauffer les aliments dans des plats ou boîtes en plastique;
- Eviter l'utilisation des films en plastique sur les aliments, particulièrement les aliments gras;
- Eviter les boîtes à manger en plastique, les remplacer par des boîtes en verre ou en inox (disponibles sur le marché) ;
- Limiter le contact des aliments avec l'air ambiant;
- Réduire au maximum la consommation des eaux embouteillées, de préférence l'eau du robinet;
- Ne pas réutiliser les bouteilles en plastique ;
- Eviter les sachets plastiques, les remplacer par les sachets en tissu, papier, liège... ;

- Limiter les emballages plastiques et choisir les moins dangereux (ils sont identifiés par des numéros de 1 à 7, spécifiques pour chaque type de plastique)
- Transvaser les aliments conditionnés dans du plastique (particulièrement les aliments gras) , dans des bocaux et bouteilles en verre;
- Eviter au maximum les aliments et boissons pré-préparés (il ne y a pas mieux que les préparations maison);
- Bien laver les fruits et légumes, les tremper dans de l'eau légèrement vinaigrée pendant 10 à 15mn;

👶 **Enfants**

- Ne jamais donner à manger dans du plastique aux enfants (bols, assiettes, biberons...), remplacer par le verre ou inox ;
- Eviter les biberons en plastique et surtout les biberons dont le plastique est abîmé, ne pas les chauffer à hautes températures et ne pas y mettre du lait très chaud;
- Utiliser les tétines en silicone sans phtalate (disponible sur le marcher) ou si c'est possible de les éviter complètement;
- Eviter les jouets en plastique, en particulier le plastique souple, les remplacer par les jouets en tissu et en bois, sans vernis et peinture. Les laver régulièrement avant l'utilisation ;
- Eviter au maximum les compotes conditionnées dans du plastique;

Environnement intérieur

- Eliminer au maximum les objets en plastique pour réduire la contamination de l'air et des poussières intérieurs;
- Éviter les revêtements plastifiés pour le sol et les murs;
- Passer l'aspirateur régulièrement pour diminuer la présence de poussières chargées en phtalates;
- Réduire ou éliminer l'usage de désodorisants et les insecticides chimiques;
- Eviter les bougies parfumées;
- Aérer régulièrement les pièces fermées, au moins 30 minutes et deux fois par jour;
- Remplacer les détergents par le vinaigre blanc, citron ou le bicarbonate de soude;

Cosmétiques

- Réduire au maximum les produits cosmétiques ou les éliminer complètement, surtout pendant la grossesse et chez les enfants (pas de parfums, pas de crèmes, pas de vernis...). Opter plutôt pour tout ce qui est naturel et traditionnel;
- Éviter les lingettes jetables et parfumées surtout pour les enfants;
- Éviter les crèmes et les cosmétiques pour les enfants, leur peau est très perméable;

Vêtements

- Laver les vêtements neufs avant de les porter, surtout ceux en contact directe avec la peau;
- Éviter les motifs décoratifs en plastique;

Dispositifs médicaux et médicaments

Les dispositifs médicaux (poches à sang, cathéter...) et certains médicaments contiennent jusqu'à 40 % de phtalates. Cependant ce n'est pas facile de contrôler ou de réduire l'exposition dans l'absence totale de l'information chez le personnel médical et le patient ne dispose d'aucun pouvoir (en plus de ne pas être informé également), malgré que certaines alternatives existent.

Et une question se pose: pourquoi les phtalates sont toujours autorisés dans le domaine médical?.

Peut être dans un premier temps il va paraître difficile d'appliquer toutes les pratiques citées pour réduire la contamination, mais je pense qu'il suffit de prendre conscience des risques liés aux phtalates pour commencer petit à petit à changer nos habitudes et faire attention à notre environnement, à ce que nous mangeons et à ce que nous exposons nos enfants.

Notre santé est dans nos assiettes et dans notre environnements

RÉFÉRENCES

1. Tyl, R.W. and M.C. Marr, Developmental Toxicity Testing — Methodology, in Developmental and reproductive toxicology. A practical approach, R.D. Hood, Editor 2006, Francis. p. 228,240.
2. Parker, R.M., Testing for Reproductive Toxicity, in Developmental and reproductive toxicology. A practical approach, T. Francis, Editor 2006, Ronald D. Hood. p. 449-457.
3. Rouiller-Fabre, V., et al., Ontogenèse et régulations des fonctions testiculaires chez le fœtus humain. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 2008. 36(9): p. 898-907.
4. Ojeda, S., et al., Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocrine reviews*, 1980. 1(3): p. 228-257.
5. Muczynski, V., Polluants environnementaux et développement du testicule foetal humain: effets et mécanismes des phtalates, 2011, Université Paris Sud-Paris XI.
6. Marty, M., et al., development and maturation of the male reproductive system, in Developmental and reproductive toxicology. A practical approach, ,, R.D. Hood, Editor 2006, Francis. p. 1033-1034.
7. Sharpe, R.M., et al., Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 2003. 125(6): p. 769-784.
8. Griswold, M.D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. in *Seminars in cell & developmental biology*. 1998. Elsevier.
9. Sharpe, R.M. and N.E. Skakkebaek, Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *The Lancet*, 1993. 341(8857): p. 1392-1396.
10. Orth, J.M., G.L. Gunsalus, and A.A. Lamperti, 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(3): p. 787-794.
11. Sharpe, R.M. and N.E. Skakkebaek, Male reproductive disorders and the role of endocrine disruption: advances in understanding and identification of areas for future research. *Pure and Applied Chemistry*, 2003. 75(11-12): p. 2023-2038.

12. Lejeune, H., R. Habert, and J. Saez, Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *Journal of molecular endocrinology*, 1998. 20(1): p. 1-25.
13. Culty, M., Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 2009. 87(1): p. 1-26.
14. Maeda, K.-I., S. Ohkura, and H. Tsukamura, Physiology of reproduction, in *The laboratory rat 2000*, Elsevier. p. 145-176.
15. Friry-Santini, C., Evaluation des effets du flutamide, molécule antiandrogénique, sur l'appareil reproducteur male chez le rat., 2007, Université Claude Bernard Lyon 1: France.
16. De Grava Kempinas, W. and G.R. Klinefelter, Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*, 2014. 4(2): p. e979114.
17. Bergman, Å., et al., State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals, 2012. *Toxicology Letters*, 2012. 211: p. S3.
18. Carlsen, E., et al., Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Bmj*, 1992. 305(6854): p. 609-613.
19. Carlsen, E., et al., Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: is there a common cause? *Environmental health perspectives*, 1995. 103(Suppl 7): p. 137.
20. Duty, S.M., et al., Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology*, 2003. 14(3): p. 269-277.
21. Erkekoglu, P. and B. Kocer-Gumusel, Environmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals: A Special Focus on Phthalates and Bisphenol A. *ENVIRONMENTAL HEALTH*, 2016: p. 155.
22. Fisher, J.S., Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction*, 2004. 127(3): p. 305-315.

23. Hauser, R., et al., Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Epidemiology*, 2006. 17(6): p. 682-691.
24. Hauser, R., et al., Male reproductive disorders, diseases, and costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015. 100(4): p. 1267-1277.
25. Kavlock, R., et al., NTP-CERHR Expert Panel update on the reproductive and developmental toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate. *Reproductive Toxicology*, 2006. 22: p. 291-399.
26. Sharpe, R.M., Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2010. 365(1546): p. 1697-1712.
27. Toppari, J., M. Kaleva, and H. Virtanen, Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Apmis*, 2001. 109(S103).
28. Toppari, J., et al., Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental health perspectives*, 1996. 104(Suppl 4): p. 741.
29. Levine, H., et al., Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Human reproduction update*, 2017. 23(6): p. 646-659.
30. Bowman, J.D., S.M. Rahman, and M. Choudhury, Endocrine Disruptors and Epigenetics. *Gene Regulation, Epigenetics and Hormone Signaling*, 2017: p. 577-606.
31. Sharpe, R.M. and N.E. Skakkebaek, Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertility and Sterility*, 2008. 89(2): p. e33-e38.
32. Skakkebaek, N.-E., E. Rajpert-De Meyts, and K. Main, Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. *Human reproduction*, 2001. 16(5): p. 972-978.

33. Society's, A.C., Testis statistics, 2018:
https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=2.152948921.1050896733.1516462459-1544675407.1516462459#!/cancer-site/Testis.
34. IARC, Testicular cancer, 2012:
<http://eco.iarc.fr/eucan/CancerOne.aspx?Cancer=30&Gender=1#block-table-f>.
35. Colborn, T., F.S. Vom Saal, and A.M. Soto, Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental health perspectives*, 1993. 101(5): p. 378.
36. Delbès, G., et al., Le testicule foetal est-il en danger? *M/S: médecine sciences*, 2005. 21(12): p. 1083-1088.
37. Delbès, G., C. Levacher, and R. Habert, Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction*, 2006. 132(4): p. 527-538.
38. Ho, S.-M., et al., Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. *Reproductive Toxicology*, 2016.
39. INSERM, *Reproduction et environnement. Expertise collective.*, 2011: Paris.
40. Jenardhanan, P., M. Panneerselvam, and P.P. Mathur. Effect of environmental contaminants on spermatogenesis. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2016. Elsevier.
41. Joffe, M., Infertility and environmental pollutants. *British medical bulletin*, 2003. 68(1): p. 47-70.
42. Kavlock, R., et al., NTP center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate. *Reproductive Toxicology*, 2002. 16(5): p. 529-653.
43. Latini, G., et al., Phthalate exposure and male infertility. *Toxicology*, 2006. 226(2): p. 90-98.
44. NICNAS, *Phthalates—final hazard assessment and compendium*, 2008: Sydney.
45. OFEV, *Perturbateurs endocriniens: fiche d'information*. 2013.

46. Pakalin, S., et al., European Union Risk Assessment Report bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), 2008, Volume.
47. Pant, N., et al., Correlation of phthalate exposures with semen quality. *Toxicology and applied pharmacology*, 2008. 231(1): p. 112-116.
48. Przybylińska, P.A. and M. Wyszowski, Environmental contamination with phthalates and its impact on living organisms. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 2016. 23(2): p. 347-356.
49. Rouiller-Fabre, V., et al., Polluants environnementaux et troubles de la reproduction masculine: les phtalates au cœur du débat. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 2011. 46(2): p. 75-81.
50. Santi, D., et al., Sperm quality and environment: A retrospective, cohort study in a Northern province of Italy. *Environmental Research*, 2016. 150: p. 144-153.
51. Schug, T.T., et al., Minireview: Endocrine Disruptors: Past Lessons and Future Directions. *Molecular Endocrinology*, 2016. 30(8): p. 833-847.
52. Shelby, M.D., NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Ntp Cerhr Mon*, 2006(18): p. v, vii-7, II-iii-xiii passim.
53. Sultan, P.C., Rapport d'expertise: l'impact des phtalates sur la Santé Humaine.
54. Swan, S.H., Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environmental Research*, 2008. 108(2): p. 177-184.
55. Wang, A., et al., Environmental influences on reproductive health, the importance of chemical exposures. *Fertility and Sterility*, 2016.
56. Wang, Y.-X., et al., Semen phthalate metabolites, semen quality parameters and serum reproductive hormones: A cross-sectional study in China. *Environmental Pollution*, 2016. 211: p. 173-182.

57. Wu, H., et al., Environmental susceptibility of the sperm epigenome during windows of male germ cell development. *Current environmental health reports*, 2015. 2(4): p. 356-366.
58. Skakkebaek, N.E., *Sperm counts, testicular cancers, and the environment*, 2017, British Medical Journal Publishing Group.
59. Skakkebaek, N.E., et al., Male reproductive disorders and fertility trends: influences of environment and genetic susceptibility. *Physiological reviews*, 2015. 96(1): p. 55-97.
60. Colborn, T., la déclaration de Wingspread, in *L'homme en voie de disparition* 1997.
61. Solecki, R., et al., Scientific principles for the identification of endocrine-disrupting chemicals: a consensus statement. *Archives of Toxicology*, 2016: p. 1-6.
62. NTP, National Toxicology Program's Report of the Endocrine Disruptors Low-Dose Peer Review. Available on the NTP web site: <http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/liason/LowDoseWebPage.html>, 2001.
63. Vandenberg, L.N., Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose-response*, 2014. 12(2): p. dose-response. 13-020. Vandenberg.
64. Vandenberg, L.N., et al., Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*, 2012. 33(3): p. 378-455.
65. vom Saal, F.S. and W.V. Welshons, NIH panel confirms that endocrine disrupting chemicals cause effects at very low doses. *Risk Pol. Rep*, 2000. 7: p. 47-50.
66. Birnbaum, L.S., Applying research to public health questions: timing and the environmentally relevant dose. *Environ. Health Perspect*, 2009. 117(11): p. A478.
67. Parrott, J.L., et al., Uncertainties in biological responses that influence hazard and risk approaches to the regulation of endocrine active substances. *Integrated environmental assessment and management*, 2017. 13(2): p. 293-301.

68. Vogel, S.A., From 'The Dose Makes the Poison' to 'The Timing Makes the Poison': Conceptualizing Risk in the Synthetic Age. *Environmental History*, 2008. 13(4): p. 667-673.
69. Zoeller, R.T. and L.N. Vandenberg, Assessing dose–response relationships for endocrine disrupting chemicals (EDCs): a focus on non-monotonicity. *ENVIRONMENTAL HEALTH*, 2015. 14(1): p. 42.
70. Dostal, L.A., et al., Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di (2-ethylhexyl) phthalate and the recovery of fertility as adults. *Toxicology and applied pharmacology*, 1988. 95(1): p. 104-121.
71. Heindel, J.J. and C.J. Powell, Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function in vitro: effects of phthalate side chain and age of animal. *Toxicology and applied pharmacology*, 1992. 115(1): p. 116-123.
72. Anway, M.D., et al., Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 2005. 308(5727): p. 1466-1469.
73. Anway, M.D. and M.K. Skinner, Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology*, 2006. 147(6): p. s43-s49.
74. Dover, G.J., The Barker hypothesis: how pediatricians will diagnose and prevent common adult-onset diseases. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 2009. 120: p. 199-207.
75. Manikkam, M., et al., Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PloS one*, 2013. 8(1): p. e55387.
76. Skinner, M.K., M. Manikkam, and C. Guerrero-Bosagna, Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2010. 21(4): p. 214-222.
77. Skinner, M.K., M. Manikkam, and C. Guerrero-Bosagna, Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reproductive toxicology*, 2011. 31(3): p. 337-343.

78. Xin, F., M. Susiarjo, and M.S. Bartolomei. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: a role for altered epigenetic regulation? in *Seminars in cell & developmental biology*. 2015. Elsevier.
79. Skinner, M.K., *Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors through the Male Germ-Line. Male-mediated Developmental Toxicity*, 2007. 2(1).
80. Estill, M.S. and S.A. Krawetz, *The Epigenetic Consequences of Paternal Exposure to Environmental Contaminants and Reproductive Toxicants. Current environmental health reports*, 2016. 3(3): p. 202-213.
81. Hales, B.F. and B. Robaire, *Paternally Mediated Effects on Development*, in *Developmental and reproductive toxicology. A practical approach*, R.D. Hood, Editor 2006.
82. Nalbone, G., *Toxicologie et Epidémiologie: deux disciplines en mutation*, in *les pathologies environnementales émergentes*, R.E.S. (RES), Editor 2013.
83. Kortenkamp, A., et al., *Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? Environmental health perspectives*, 2007. 115(Suppl 1): p. 106.
84. Ribeiro, E., C. Ladeira, and S. Viegas, *EDCs mixtures: a stealthy hazard for human health? Toxics*, 2017. 5(1): p. 5.
85. OFSP, *Les phtalates: Fiche d'information*, 2012.
86. INERIS, *Di-(2-éthylhexyl) phtalate (DEHP). Données technico-économiques sur les substances chimiques en France*. . 2005: p. 15-16.
87. ECPI, *Informations sur les phtalates*., 2012: Paris.
88. ATSDR, *Toxicological Profile for Di(2-Ethylhexyl) Phthalate*. U.S. Department of health and human services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2002.
89. IARC, *Di (2-ethylhexyl) phthalate*, in *Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans/World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*2013.

90. INRS, Phtalate de bis(2-ethylhexyle). 2013: Paris.
91. REACH, Bis(2-ethylhexyl) phthalate: General information, 2017: <https://echa.europa.eu/fr/registration-dossier/-/registered-dossier/15358/1>.
92. INERIS, Di(2-Ethylhexyl)Phtalate (DEHP) : Stratégie de réduction de la concentration dans les cours d'eau. Rapport d'étude N° DRC-10-102861-02415A., 2010.
93. Biscardi, D., et al., Evaluation of the migration of mutagens/carcinogens from PET bottles into mineral water by Tradescantia/micronuclei test, Comet assay on leukocytes and GC/MS. *Science of the Total Environment*, 2003. 302(1): p. 101-108.
94. Casajuana, N. and S. Lacorte, Presence and release of phthalic esters and other endocrine disrupting compounds in drinking water. *Chromatographia*, 2003. 57(9): p. 649-655.
95. Fankhauser-Noti, A. and K. Grob, Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: investigation of the sources, tips and tricks. *Analytica Chimica Acta*, 2007. 582(2): p. 353-360.
96. Montuori, P., et al., Assessing human exposure to phthalic acid and phthalate esters from mineral water stored in polyethylene terephthalate and glass bottles. *Food Additives and Contaminants*, 2008. 25(4): p. 511-518.
97. Bach, C., et al., Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: a source of controversy reviewed. *Water research*, 2012. 46(3): p. 571-583.
98. Dargnat, C., Sources, transfert et devenir des phtalates sur le bassin versant de la Seine: caractérisation des dangers pour l'environnement et les écosystèmes, 2008, Paris 6.
99. Yang, J., R. Hauser, and R.H. Goldman, Taiwan food scandal: The illegal use of phthalates as a clouding agent and their contribution to maternal exposure. *Food and chemical toxicology*, 2013. 58: p. 362-368.

100. Huber, W.W., B. Grasl-Kraupp, and R. Schulte-Hermann, Hepatocarcinogenic potential of di (2-ethylhexyl) phthalate in rodents and its implications on human risk. *Critical reviews in toxicology*, 1996. 26(4): p. 365-481.
101. Wittassek, M., et al., Assessing exposure to phthalates—the human biomonitoring approach. *Molecular nutrition & food research*, 2011. 55(1): p. 7-31.
102. OFEV, *Compte rendu sur l'environnement*, 2011.
103. Rank, J., Classification and risk assessment of chemicals: the case of DEHP in the light of REACH. *The Journal of Transdisciplinary Environmental Studies*, 2005. 4(3): p. 1-15.
104. Cirillo, T. and R.A. Cocchieri, *Phthalates in foods. Persistent Organic Pollutants and Toxic Metals in Foods*. Woodhead Publishing Limited, 2013: p. 334-366.
105. Moret, S., et al., *Sample Preparation Techniques for the Determination of Some Food Contaminants (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Mineral Oils and Phthalates)*-4.14. 2012.
106. Wenzl, T., *Methods for the determination of phthalates in food. Outcome of a survey*, 2009.
107. Cavaliere, B., et al., Tandem mass spectrometry in food safety assessment: the determination of phthalates in olive oil. *Journal of Chromatography A*, 2008. 1205(1): p. 137-143.
108. Fusari, P. and P. Rovellini, *Liquid chromatography-Ion Trap-ESI-mass spectrometry in food safety assessment: phthalates in vegetable oils*. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 2009. 86: p. 25-30.
109. Mariani, C., S. Venturini, and K. Grob, *Sulla presenza di ftalati negli oli vegetali*. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 2006. 83(6): p. 251-256.
110. Zolfaghari, M., et al., Occurrence, fate and effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate in wastewater treatment plants: A review. *Environmental Pollution*, 2014. 194: p. 281-293.

111. Koch, H.M., H. Drexler, and J. Angerer, An estimation of the daily intake of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *International journal of hygiene and environmental health*, 2003. 206(2): p. 77-83.
112. Sathyanarayana, S., et al., Unexpected results in a randomized dietary trial to reduce phthalate and bisphenol A exposures. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 2013. 23(4): p. 378-384.
113. Ricard, L.-E., 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 bisphenol A, in faculté de médecine de Nancy2011, Université Henri Poincaré, Nancy 1: Paris.
114. AFSSAPS, Recommandations portant sur les phtalates dans les dispositifs médicaux, 2009, Département surveillance du marché.
115. Lee, S., et al., Fetal Exposure to Low Levels of the Plasticizer DEHP Predisposes the Adult Male Adrenal Gland to Endocrine Disruption. *Endocrinology*, 2017. 158(2): p. 304-318.
116. EFSA, 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, 2005.
117. Wolfe, G. and K. Layton, Diethylhexylphthalate: Multigenerational reproductive assessment by continuous breeding when administered to Sprague-Dawley rats in the diet. *Govt Reports Announcements*, TherImmune Research Corp., Gaithersburg, MD, 2003. 12.
118. REACH, Bis(2-ethylhexyl) phthalate:Derived No Effect Level (DNEL), 2017: <https://echa.europa.eu/fr/registration-dossier/-/registered-dossier/15358/7/1>.
119. WHO, Guidelines for drinking-water quality. *WHO chronicle*, 2011. 38(Edition, Fourth): p. 104-8.
120. CE, Règlement (UE) 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, C. Européenne, Editor 2011, *Journal officiel de l'Union européenne*.

121. EC, Commission implementing decision of 4.7.2017 on the identification of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), dibutyl phthalate (DBP), benzyl butyl phthalate (BBP) and diisobutyl phthalate (DIBP) as substances of very high concern according to Article 57(f) of Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council, in C(2017) 4462 final2017, European Commission: Brussels.
122. REACH, Bis(2-ethylhexyl) phthalate: Classification and Labelling, 2017: <https://echa.europa.eu/fr/registration-dossier/-/registered-dossier/15358/2/1>.
123. Bonde, J.P., Male reproductive organs are at risk from environmental hazards. *Asian J Androl*, 2010. 12(2): p. 152-156.
124. Dobrzyńska, M., Phthalates-widespread occurrence and the effect on male gametes. Part 2. The effects of phthalates on male gametes and on the offspring. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 2016. 67(3): p. 209.
125. Wittassek, M., et al., Daily intake of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by German children—A comparison of two estimation models based on urinary DEHP metabolite levels. *International journal of hygiene and environmental health*, 2007. 210(1): p. 35-42.
126. Zhang, Y., L. Zheng, and B.-H. Chen, Phthalate exposure and human semen quality in Shanghai: a cross-sectional study. *Biomedical and environmental sciences: BES*, 2006. 19(3): p. 205-209.
127. Foster, P., Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *International journal of andrology*, 2006. 29(1): p. 140-147.
128. Rozati, R., et al., Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertility and Sterility*, 2002. 78(6): p. 1187-1194.
129. Swan, S., et al., First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. *Human reproduction*, 2015. 30(4): p. 963-972.
130. Kay, V.R., M.S. Bloom, and W.G. Foster, Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in males. *Critical reviews in toxicology*, 2014. 44(6): p. 467-498.

131. Lyche, J.L., et al., Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 2009. 12(4): p. 225-249.
132. Mariana, M., et al., The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review. *Environment International*, 2016.
133. Martino-Andrade, A.J. and I. Chahoud, Reproductive toxicity of phthalate esters. *Molecular nutrition & food research*, 2010. 54(1): p. 148-157.
134. Agarwal, D.K., S. Eustis, and J.C. Lamb, Effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on the gonadal pathophysiology, sperm morphology, and reproductive performance of male rats. *Environmental health perspectives*, 1986. 65: p. 343.
135. Akingbemi, B.T., et al., Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(3): p. 775-780.
136. Dobrzynska, M.M., et al., Two generation reproductive and developmental toxicity following subchronic exposure of pubescent male mice to di (2-ethylhexyl) phthalate. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2012. 19(1).
137. Gangolli, S., Testicular effects of phthalate esters. *Environmental health perspectives*, 1982. 45: p. 77.
138. Gray, T. and S.D. Gangolli, Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environmental health perspectives*, 1986. 65: p. 229.
139. Parmar, D., S.P. Srivastava, and P.K. Seth, Effect of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on spermatogenesis in adult rats. *Toxicology*, 1986. 42(1): p. 47-55.
140. Siddiqui, A. and S.P. Srivastava, Effect of di (2-ethylhexyl) phthalate administration on rat sperm count and on sperm metabolic enzymes. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 1992. 48(1): p. 115-119.
141. Singh, A., W. Lawrence, and J. Autian, Teratogenicity of phthalate esters in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1972. 61(1): p. 51-55.

142. Singh, A., W. Lawrence, and J. Autian, Mutagenic and antifertility sensitivities of mice to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and dimethoxyethyl phthalate (DMEP). *Toxicology and applied pharmacology*, 1974. 29(1): p. 35-46.
143. Seth, P.K., et al., Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on rat gonads. *Environmental Research*, 1976. 12(2): p. 131-138.
144. Agarwal, D., W. Lawrence, and J. Autian, Antifertility and mutagenic effects in mice from parenteral administration of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 1985. 16(1): p. 71-84.
145. Agarwal, D.K., et al., Effects of parenteral di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on gonadal biochemistry, pathology, and reproductive performance of mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 1989. 26(1): p. 39-59.
146. Sjöberg, P., N.G. Lindqvist, and L. Plöen, Age-dependent response of the rat testes to di (2-ethylhexyl) phthalate. *Environmental health perspectives*, 1986. 65: p. 237.
147. Ge, R.S., et al., Biphasic effects of postnatal exposure to diethylhexylphthalate on the timing of puberty in male rats. *Journal of andrology*, 2007. 28(4): p. 513-520.
148. Zhao, J., et al., di-(2-ethylhexyl) phthalate increases obesity-induced damage to the male reproductive system in mice. 2017.
149. Zhu, L., et al., Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces apoptosis of GC-2spd cells via TR4/Bcl-2 pathway. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2016. 44: p. 18-24.
150. Andrade, A.J., et al., A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology*, 2006. 228(1): p. 85-97.
151. Andrade, A.J., et al., A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): effects on androgenic status, developmental landmarks and testicular histology in male offspring rats. *Toxicology*, 2006. 225(1): p. 64-74.
152. Christiansen, S., et al., Low-dose perinatal exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate induces anti-androgenic effects in male rats. *Reproductive Toxicology*, 2010. 30(2): p. 313-321.

153. Dalsenter, P., et al., Phthalate affect the reproductive function and sexual behavior of male Wistar rats. *Human & experimental toxicology*, 2006. 25(6): p. 297-303.
154. Gray, L.E., et al., Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicological sciences*, 2000. 58(2): p. 350-365.
155. Dorostghoal, M., A.A. Moazedi, and A. Zardkaf, Long-term effects of maternal exposure to Di (2-ethylhexyl) Phthalate on sperm and testicular parameters in Wistar rats offspring. *Iranian journal of reproductive medicine*, 2012. 10(1): p. 7.
156. Vo, T.T., et al., Differential effects of flutamide and di-(2-ethylhexyl) phthalate on male reproductive organs in a rat model. *Journal of Reproduction and Development*, 2009. 55(4): p. 400-411.
157. Hu, G., et al., In utero combined di-(2-ethylhexyl) phthalate and diethyl phthalate exposure cumulatively impairs rat fetal Leydig cell development. *Toxicology*, 2018.
158. Chen, J., et al., The mechanism of environmental endocrine disruptors (DEHP) induces epigenetic transgenerational inheritance of cryptorchidism. *PloS one*, 2015. 10(6): p. e0126403.
159. Doyle, T.J., et al., Transgenerational effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on testicular germ cell associations and spermatogonial stem cells in mice. *Biology of reproduction*, 2013. 88(5).
160. Gray, L.E., et al., Transgenerational effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate in the male CRL: CD (SD) rat: added value of assessing multiple offspring per litter. *Toxicological sciences*, 2009: p. kfp109.
161. Dobrzyńska, M.M., U. Czajka, and E.J. Tyrkiel, Male-Mediated F1 Effects in Mice Exposed to Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), in *Male-mediated Developmental Toxicity* 2007. p. 97-113.
162. Do, R.P., et al., 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*, 2012. 34(4): p. 614-621.

163. Pocar, P., et al., Exposure to di (2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) in utero and during lactation causes long-term pituitary-gonadal axis disruption in male and female mouse offspring. *Endocrinology*, 2012. 153(2): p. 937-948.
164. Fiandanese, N., et al., Maternal exposure to a mixture of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and polychlorinated biphenyls (PCBs) causes reproductive dysfunction in adult male mouse offspring. *Reproductive Toxicology*, 2016. 65: p. 123-132.
165. Wang, Y., et al., Di (2-ethylhexyl) phthalate exposure in utero damages Sertoli cell differentiation via disturbance of sex determination pathway in fetal and postnatal mice. *Toxicological sciences*, 2016. 152(1): p. 53-61.
166. Abdel-Maksoud, F., et al., Exposures of male rats to environmental chemicals [bisphenol A and di (2-ethylhexyl) phthalate] affected expression of several proteins in the developing epididymis. *Andrology*, 2018. 6(1): p. 214-222.
167. Zhang, X.-F., et al., Effects of diethylhexyl phthalate (DEHP) given neonatally on spermatogenesis of mice. *Molecular biology reports*, 2013. 40(11): p. 6509-6517.
168. Hsu, P.C., et al., The adverse effects of low-dose exposure to Di (2-ethylhexyl) phthalate during adolescence on sperm function in adult rats. *Environmental toxicology*, 2016. 31(6): p. 706-712.
169. Dévier, M.-H., et al., Ultra-trace analysis of hormones, pharmaceutical substances, alkylphenols and phthalates in two French natural mineral waters. *Science of the Total Environment*, 2013. 443: p. 621-632.
170. Guo, Y. and K. Kannan, Challenges encountered in the analysis of phthalate esters in foodstuffs and other biological matrices. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2012. 404(9): p. 2539-2554.
171. Kayali, N., F.G. Tamayo, and L.M. Polo-Díez, Determination of diethylhexyl phthalate in water by solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography. *Talanta*, 2006. 69(5): p. 1095-1099.
172. INERIS, Journée technique phthalates, 2011, AQUAREF.
173. Cao, X.L., Phthalate esters in foods: sources, occurrence, and analytical methods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2010. 9(1): p. 21-43.

174. Lv, X., Y. Hao, and Q. Jia, Preconcentration procedures for phthalate esters combined with chromatographic analysis. *Journal of chromatographic science*, 2013. 51(7): p. 632-644.
175. Penalver, A., et al., Determination of phthalate esters in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of chromatography A*, 2000. 872(1): p. 191-201.
176. Farajzadeh, M.A., et al., Microextraction methods for the determination of phthalate esters in liquid samples: A review. *Journal of Separation Science*, 2015. 38(14): p. 2470-2487.
177. Pichon, V., *Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques* 2006: Ed. Techniques Ingénieur.
178. Alvarez, D.A. and T.L. Jones-Lepp, 11 Sampling and Analysis of Emerging Pollutants. *Water Quality Concepts, Sampling, and Analyses*, 2010: p. 199.
179. Marin, M. and F. Rene, Lyophilisation. *Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire*, 2000. 2(F3240): p. F3240. 1-F3240. 11.
180. Toulemonde, M., *La Lyophilisation*.
181. Singh, B., A. Kumar, and A.K. Malik, Recent advances in sample preparation methods for analysis of endocrine disruptors from various matrices. *Critical reviews in analytical chemistry*, 2014. 44(3): p. 255-269.
182. Ling, W., et al., Cloud point extraction coupled with HPLC-UV for the determination of phthalate esters in environmental water samples. *Journal of Environmental Sciences*, 2007. 19(7): p. 874-878.
183. Wu, Q., et al., Extraction of phthalate esters from water and beverages using a graphene-based magnetic nanocomposite prior to their determination by HPLC. *Microchimica Acta*, 2012. 177(1-2): p. 23-30.
184. Sun, M., et al., Graphene reinforced hollow fiber liquid-phase microextraction for the determination of phthalates in water, juice and milk samples by HPLC. *Analytical Methods*, 2013. 5(20): p. 5694-5700.

185. Zaater, M.F., Y.R. Tahboub, and A.N. Al Sayyed, Determination of phthalates in Jordanian bottled water using GC–MS and HPLC–UV: environmental study. *Journal of chromatographic science*, 2013. 52(5): p. 447-452.
186. Jara, S., et al., Determination of phthalates in water samples using polystyrene solid-phase extraction and liquid chromatography quantification. *Analytica Chimica Acta*, 2000. 407(1): p. 165-171.
187. Amiridou, D. and D. Voutsas, Alkylphenols and phthalates in bottled waters. *Journal of hazardous materials*, 2011. 185(1): p. 281-286.
188. Leivadara, S.V., A.D. Nikolaou, and T.D. Lekkas, Determination of organic compounds in bottled waters. *Food Chemistry*, 2008. 108(1): p. 277-286.
189. Cao, X.-L., Determination of phthalates and adipate in bottled water by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 2008. 1178(1): p. 231-238.
190. Ceretti, E., et al., Comparative assessment of genotoxicity of mineral water packed in polyethylene terephthalate (PET) and glass bottles. *Water research*, 2010. 44(5): p. 1462-1470.
191. Polo, M., et al., Multivariate optimization of a solid-phase microextraction method for the analysis of phthalate esters in environmental waters. *Journal of chromatography A*, 2005. 1072(1): p. 63-72.
192. Serôdio, P. and J. Nogueira, Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water. *Water research*, 2006. 40(13): p. 2572-2582.
193. Keresztes, S., et al., Study on the leaching of phthalates from polyethylene terephthalate bottles into mineral water. *Science of the Total Environment*, 2013. 458: p. 451-458.
194. Al Rayes, L., Étude des interactions PET-Eau minérale dans les eaux embouteillées au Liban et approches analytiques des risques sanitaires, 2013, Université Claude Bernard-Lyon I.
195. Guart, A., et al., Effect of bottling and storage on the migration of plastic constituents in Spanish bottled waters. *Food Chemistry*, 2014. 156: p. 73-80.

196. Bošnjir, J., et al., Migration of phthalates from plastic containers into soft drinks and mineral water. *Food Technology and Biotechnology*, 2007. 45(1): p. 91-95.
197. Caude, M. and A. Jardy, *Chromatographie en phase, liquide: Théorie et méthodes de séparation*. Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation, 1994. 2(P1455): p. p1455. 1-p1455. 44.
198. LaFleur, A.D. and K.A. Schug, A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Analytica Chimica Acta*, 2011. 696(1): p. 6-26.
199. Wolfe, G. and K. Layton, Multigeneration reproduction toxicity study in rats (unaudited draft): Diethylhexylphthalate: Multigenerational reproductive assessment by continuous breeding when administered to Sprague-Dawley rats in the diet. TherImmune Research Corporation (Gaithersburg, Maryland), TRC Study, 2003(7244-200).
200. Anderson, S., et al. Reproductive toxicity of methoxychlor (m) in corn-oil to male and female long-evans hooded rats using the alternative reproduction test protocol (art). in *Biology of reproduction*. 1994. SOC study reproduction 1603 Monroe ST, Madison, WI 53711-2021.
201. Anderson, S., et al., 'Validation of the alternative reproductive test protocol (ART) to assess toxicity of methoxychlor in rats. *The Toxicologist*, 1995. 15: p. 164.
202. STPpharma, *Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches*, 2003, STP PHARMA PRATIQUES.
203. ICH, *Validation of analytical procedures: text and methodology*, in Q2 (R1)2005, ICH Harmonised Tripartite Guideline.
204. Hirsch, R., et al., Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1998. 815(2): p. 213-223.
205. Gray, L.E., et al., The development of a protocol to assess reproductive effects of toxicants in the rat. *Reproductive Toxicology*, 1988. 2(3-4): p. 281-287.

206. Wolf, C., et al., Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p, p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl-and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicology and industrial health*, 1999. 15(1-2): p. 94-118.
207. Schilling, K., C. Gembardt, and J. Hellwig, Di-2-ethylhexyl phthalate—Two-generation reproduction toxicity study in Wistar rats, continuous dietary administration. Ludwigshafen Germany: BASF Aktiengesellschaft, 2001.
208. Erkekoglu, P., et al., Reproductive toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate in selenium-supplemented and selenium-deficient rats. *Drug and chemical toxicology*, 2011. 34(4): p. 379-389.
209. Hsu, P.C., et al., The adverse effects of low-dose exposure to Di (2-ethylhexyl) phthalate during adolescence on sperm function in adult rats. *Environmental toxicology*, 2014.
210. Li, L., et al., A single dose of Di-(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal rats alters gonocytes, reduces sertoli cell proliferation, and decreases cyclin D2 expression. *Toxicology and applied pharmacology*, 2000. 166(3): p. 222-229.
211. Holson, J.F., et al., Significance, reliability, and interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings. *Developmental and Reproductive Toxicology: A practical Approach*. Taylor & Francis, USA, 2006: p. 389.
212. Kim, H.-S., et al., Short period exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. *Archives of Toxicology*, 2003. 77(8): p. 446-451.
213. Vo, T.T., et al., Di-(2 ethylhexyl) phthalate and flutamide alter gene expression in the testis of immature male rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2009. 7(1): p. 104.
214. Akingbemi, B.T., et al., Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di (2-ethylhexyl) phthalate. *Biology of reproduction*, 2001. 65(4): p. 1252-1259.

215. Quinlivan, K.M., et al., Direct and transgenerational effects of low doses of perinatal di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on social behaviors in mice. *PloS one*, 2017. 12(2): p. e0171977.
216. Noriega, N., et al., Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production, and inhibits reproductive tract development in male Sprague-Dawley and Long-Evans rats. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 2009. 111(1): p. 163.
217. Singh, S. and S.S.-L. Li, Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol a and phthalates. *International journal of molecular sciences*, 2012. 13(8): p. 10143-10153.
218. Balafas, D., K. Shaw, and F. Whitfield, Phthalate and adipate esters in Australian packaging materials. *Food chemistry*, 1999. 65(3): p. 279-287.