

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

People's Democratic Republic Of Algeria

The Minister Of Higher Education And Scientific Research

ABOU BEKR BELKAID UNIVERSITY OF TLEMCEM

FACULTY OF MEDICINE

Dr. B. BENZERDJEB



جامعة أبو بكر بلقايد - تلمسان

كلية الطب

د. ب. بن زرجب

THESE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE DOCTORAT
EN SCIENCES MEDICALES

*EVALUATION DES NIVEAUX D'EXPOSITION AUX PHTALATES
CHEZ UNE POPULATION URBAINE*

Présentée par

Dr. ABOUREJAL Nesrine ép BENAMARA

Maître Assistant en Toxicologie

Jury

Président

Pr. Barkahoum ALAMIR SLAMA

Faculté de Médecine d'Alger

Membres

Pr. Rachid DJAFER

Faculté de Médecine d'Annaba

Pr. Mohamed El Amine AMANI

Faculté de Médecine d'Oran

Pr. Mohammed Chems Eddine SMAHI

Faculté de Médecine de Tlemcen

Directeur de thèse

Pr. Haciba REZK-KALLAH

Faculté de Médecine d'Oran

TABLE DES MATIERES

| | |
|------------------------|------|
| Liste des abréviations | V |
| Liste des figures | VIII |
| Liste des tableaux | IX |

| | |
|------------------|----------|
| PREAMBULE | 1 |
|------------------|----------|

CHAPITRE I : Revue Bibliographique

| | |
|---|-----------|
| I. GENERALITES : | 1 |
| I.1 Définition : | 1 |
| I.2 Historique : | 1 |
| I.3 Classification des phtalates : | 2 |
| I.4 Propriétés physico-chimiques : | 3 |
| I.5 Comportement des phtalates dans l'environnement : | 5 |
| II. USAGES ET SOURCES D'EXPOSITIONS AUX PHTALATES : | 5 |
| II.1 Usages des phtalates : | 5 |
| II.1.1 Usage en tant que plastifiants :..... | 5 |
| II.1.2 Usage dans les produits cosmétiques :..... | 6 |
| II.1.3 Autres usages :..... | 6 |
| II.2 Sources d'exposition aux phtalates : | 7 |
| II.2.1 Contamination des aliments :..... | 7 |
| II.2.1.1 Apport par migration à partir des matériaux au contact des denrées alimentaires :..... | 7 |
| II.2.1.2 Eaux embouteillées :..... | 8 |
| II.2.2 Produits cosmétiques :..... | 8 |
| II.2.3 Autres sources d'exposition :..... | 8 |
| II.2.3.1 Contamination de l'air :..... | 8 |
| II.2.3.2 Jouets en plastiques :..... | 9 |
| II.2.3.3 Nutrition parentérale et dispositif de santé :..... | 9 |
| III. TOXICOCINETIQUE DES PHTALATES : | 11 |
| III.1 Absorption : | 12 |
| III.1.1 Phtalates introduits par voie orale :..... | 12 |
| III.1.2 Phtalates introduits par voie respiratoire :..... | 12 |
| III.1.3 Phtalates introduits par voie cutanée :..... | 12 |
| III.2 Distribution : | 13 |
| III.3 Métabolisme : | 13 |
| III.4 Élimination : | 16 |
| IV. TOXICITE DES PHTALATES : | 17 |

| | |
|--|-----------|
| IV.1 Mécanisme d'action toxique : | 17 |
| IV.1.1 Mécanisme d'action moléculaire : | 17 |
| IV.1.2 Modulation Epigénétique : | 19 |
| IV.1.3 Mécanisme d'action des phtalates chez la femme : | 21 |
| IV.1.4 Mécanisme d'action des phtalates chez l'homme : | 22 |
| IV.1.5 Mécanisme d'action des phtalates et obésité : | 23 |
| IV.1.6 Mécanisme d'action des phtalates et cancer : | 24 |
| IV.2 Effets sanitaires des phtalates : | 25 |
| IV.2.1 Effets sur le foie : | 25 |
| IV.2.2 Effets sur la thyroïde et le système immunitaire : | 26 |
| IV.2.3 Effets sur la reproduction : | 26 |
| IV.2.3.1 Fonction de reproduction chez la femme : | 27 |
| IV.2.3.2 Fonction de reproduction chez l'homme : | 28 |
| IV.2.4 Effets cancérigènes : | 28 |
| IV.2.5 Effets mutagènes et tératogènes : | 29 |
| IV.2.6 Effets perturbateurs endocriniens : | 29 |
| IV.2.6.1 Effets oestrogènes : | 29 |
| IV.2.6.2 Effets anti-oestrogène : | 30 |
| IV.2.6.3 Effets anti-androgènes : | 31 |
| IV.2.7 ASTHME : | 32 |
| IV.2.8 AUTISME : | 33 |
| IV.2.9 OBESITE : | 34 |
| IV.2.10 Troubles du comportement : | 34 |
| IV.2.11 DIABETE : | 35 |
| V. METHODES D'ANALYSE TOXICOLOGIQUE DES PHTALATES : | 35 |
| V.1 Prétraitement des échantillons : | 35 |
| V.1.1 Les méthodes d'extraction : | 36 |
| V.1.1.1 Extraction liquide-liquide : | 36 |
| V.1.1.2 Extraction en phase solide : | 37 |
| V.1.2 Purification de l'extrait : | 40 |
| V.1.3 Concentration de l'extrait : | 40 |
| V.2 Les méthodes d'analyses : | 41 |
| V.2.1 Analyse par GC-SM : | 41 |
| V.2.1.1 Dérivatisation de l'échantillon : | 41 |
| V.2.1.2 Détection par spectromètre de masse (MSD) : | 41 |
| V.2.1.3 Optimisation de la technique : | 42 |
| V.2.1.4 Avantage et inconvénient : | 44 |
| V.2.2 Analyse par chromatographie en phase liquide : | 44 |
| V.2.2.1 Détection par spectromètre de masse (MSD) : | 44 |
| V.2.3 Assurance qualité : | 45 |
| V.2.3.1 Facteurs influençant l'interprétation des données sur les métabolites du phtalate urinaire : | 45 |
| V.2.3.2 Le problème de blanc et système chromatographique : | 46 |
| VI. NORMES ET REGLEMENTATION : | 47 |
| VI.1 La réglementation européenne : | 47 |
| VI.1.1 Le classement des phtalates : | 47 |
| VI.1.2 La réglementation par domaine : | 49 |
| VI.1.2.1 Jouets et articles de puériculture : | 49 |
| VI.1.2.2 Le matériel médical : | 50 |
| VI.1.2.3 Les matériaux de contact alimentaire : | 50 |
| VI.1.2.4 Dans les produits cosmétiques : | 52 |
| VI.2 La réglementation au Canada : | 53 |

CHAPITRE II : Etude Pratique

| | |
|---|-------------------------------------|
| I. OBJECTIFS : | 56 |
| I.1 Objectif principal : | 56 |
| I.2 Objectifs secondaires : | 56 |
| II. MATERIEL ET METHODES : | 56 |
| II.1 Type d'étude : | 56 |
| II.2 Échantillonnage : | 56 |
| II.2.1 Population d'étude : | 56 |
| II.2.2 Eau destinée à la consommation : | 57 |
| II.3 Recueil d'information : | 57 |
| II.4 Éthique : | 57 |
| II.5 Déroulement de l'étude : | 57 |
| II.5.1 Paramètres à doser :..... | 57 |
| II.5.1.1 Prélèvements biologiques | 57 |
| II.5.1.2 Prélèvement d'eau..... | 58 |
| II.5.2 Prélèvements et conservation :..... | 58 |
| II.5.2.1 Prélèvements biologiques | 58 |
| II.5.2.2 Prélèvement d'eau..... | 58 |
| II.5.3 Dosage des phtalates : | 59 |
| II.5.3.1 Verrerie : | 59 |
| II.5.3.2 Matériels :..... | 59 |
| II.5.3.3 Produits chimiques et réactifs : | 59 |
| II.5.3.4 Préparations des solutions :..... | 60 |
| II.5.3.5 Procédure d'extraction : | Error! Bookmark not defined. |
| II.5.3.6 Instrument d'analyse : | Error! Bookmark not defined. |
| II.6 Analyse des données : | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.1 Génération des variables :..... | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.1.1 La variable âge..... | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.1.2 La variable « indice de masse corporelle : IMC »..... | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.1.3 La variable « activité physique »..... | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.1.4 La variable « apport quotidien en phtalate »..... | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.1.5 La variable Hazard Quotient et Hazard Index : | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.1.6 La variable EDI :..... | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.1.7 La variable Hazard Quotient pour l'eau : | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.1.8 La variable contribution de l'apport quotidien via l'eau :.... | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.1.9 Le risque de développer un cancer (ECR) : | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.2 Analyse statistique : | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.2.1 Logiciel utilisé : | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.2.2 Analyse descriptive : | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.2.3 Analyse univariée :..... | Error! Bookmark not defined. |
| II.6.2.4 Analyse bivariée :..... | Error! Bookmark not defined. |
| III. RESULTATS..... | ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED. |
| III.1 Caractéristiques descriptives de la population : | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.1 Données sociodémographiques : | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.1.1 Origine géographique :..... | Error! Bookmark not defined. |

| | | |
|--------------|--|-------------------------------------|
| III.1.1.2 | Le sexe : | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.1.3 | L'âge : | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.1.4 | Situation familiale : | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.1.5 | Niveau d'instruction : | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.1.6 | Niveau économique..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.2 | Données de santé..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.2.1 | IMC : | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.2.2 | Ménopause..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.2.3 | Notion de tabagisme : | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.2.4 | Antécédents médicaux..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.2.5 | Activité physique | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.3 | Enquête sur la consommation d'eau..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.3.1 | Nature de l'eau consommée :..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.3.2 | Consommation journalière de l'eau :..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.3.3 | Récipient de conservation..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.3.4 | Température de conservation :..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.3.5 | Lieu de conservation | Error! Bookmark not defined. |
| III.1.3.6 | Réutilisation des bouteilles en plastiques | Error! Bookmark not defined. |
| III.2 | Résultats biologiques..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.2.1 | Le taux de la créatinine urinaire : | Error! Bookmark not defined. |
| III.2.1.1 | Créatininurie en fonction du sexe : | Error! Bookmark not defined. |
| III.2.1.2 | Créatininurie en fonction d'âge : | Error! Bookmark not defined. |
| III.2.2 | Les taux des métabolites de phtalates dans les urines..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.2.2.1 | Corrélation entre les taux des métabolites des phtalates avec et sans ajustement..... | Error! Bookmark not defined. |
| | Bookmark not defined. | |
| III.2.2.2 | Corrélation entre les taux des métabolites des phtalates après ajustement | Error! Bookmark not defined. |
| | not defined. | |
| III.2.2.3 | Les taux des métabolites des phtalates en fonction du sexe. | Error! Bookmark not defined. |
| III.2.2.4 | Les taux des métabolites des phtalates en fonction de l'âge | Error! Bookmark not defined. |
| III.2.2.5 | Les taux des métabolites des phtalates en fonction de l'IMC | Error! Bookmark not defined. |
| | defined. | |
| III.2.2.6 | Estimation de l'apport quotidien en phtalate..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.2.2.7 | L'apport quotidien en phtalate en fonction du sexe..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.2.2.8 | L'apport quotidien en phtalate en fonction de l'âge | Error! Bookmark not defined. |
| III.2.2.9 | Estimation du Hazard quotient et Hazard index..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.2.2.10 | La répartition des taux de HI en fonction du sexe | Error! Bookmark not defined. |
| III.2.2.11 | La répartition des taux de HI en fonction de l'âge | Error! Bookmark not defined. |
| III.2.3 | Étude analytique des associations des métabolites des phtalates avec les différentes variables | Error! Bookmark not defined. |
| | Error! Bookmark not defined. | |
| III.2.3.1 | Étude des corrélations des métabolites des phtalates avec les variables qualitatives... | Error! Bookmark not defined. |
| | Bookmark not defined. | |
| III.2.3.2 | Étude des corrélations des métabolites des phtalates avec les variables quantitatives. | Error! Bookmark not defined. |
| | Bookmark not defined. | |
| III.3 | Résultats de l'analyse de l'eau | Error! Bookmark not defined. |
| III.3.1 | Les taux des phtalates dans l'eau analysée immédiatement..... | Error! Bookmark not defined. |
| III.3.2 | Les taux des phtalates dans l'eau analysée après exposition au soleil | Error! Bookmark not defined. |
| | defined. | |
| III.3.3 | Les taux des phtalates dans l'eau analysée après conservation au froid | Error! Bookmark not defined. |
| | defined. | |
| III.3.4 | Les taux des phtalates dans l'eau analysée dans les trois conditions | Error! Bookmark not defined. |
| | defined. | |
| III.3.5 | Apport quotidien en phtalate via l'eau embouteillée | Error! Bookmark not defined. |
| III.3.6 | Hazard quotient via l'eau embouteillée | Error! Bookmark not defined. |
| III.3.7 | Contribution à la contamination au phtalate via l'eau embouteillée | Error! Bookmark not defined. |
| | defined. | |
| III.3.8 | Risque du cancer due aux phtalate via l'exposition à l'eau (ECR) | Error! Bookmark not defined. |
| IV. | DISCUSSION | ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED. |

V. CONCLUSION.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Annexe I :

Annexe II :

Annexe III :

Annexe IV :

Annexe V :

A

ADN : Acide désoxyribonucléique
AhR : Récepteur aryl-hydro-carbone
AKT : Virus oncogene cellular homolog
AMPC: Adénosine monophosphate cyclique
AP1 : Activator protein 1

B

BBzP ,BBP : Butyl benzyl phtalate
Bcl : B cellule leukemia
BSTFA : N,O- Bis(triméthylsilyl)trifluoracétamide

C

CAR : Récepteur androstanique constitutif
CE : Commission européenne
CELLULE Th2 : Lymphocyte T auxiliaires e sous type 2
CLP : Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures
CMR : Cancérogènes, Mutagènes et toxiques pour la Reproduction
c-myc : Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
CSSC : Comité Scientifique Européen pour la Sécurité des Consommateurs
CYP : Cytochrome P

D

DAP : Diallyle phtalate
DCE : Directive cadre sur l'eau
DCP : Di-cyclohexyle phtalate
DEHP : Di(2-ethylhexyl) phtalate
DEP : Diéthyle de phtalate
DI : Daily intake
DIBP : Di-iso-butylphtalate
DIDP : Di-isodécyle phtalate
DIHP : Di-isoheptyle phtalate
DJT : Dose journalière tolérable
DMP : Diméthyle phtalate
DnBP : Dibutyl phtalate
DNIP : Di-isononyle phtalate
DNPP: Di-n-pentyl phthalate
DOP, DNOP : Di-n-octyle phtalate
DSD : Directive Substances dangereuses
DUP : Diundécyle phtalate
DVB : Divinylbenzène

E

EFSA: European food safety authority

ERalpha : Récepteur des œstrogènes

ESI-MS : Electrospray ionisation – spectrophotométrie de masse

F

FABP : Protéine de liaison aux acides gras

FDA: Food and drug administration

FSH: Hormone folliculo-stimulante (follicle stimulating hormone)

G

GC-MS : Gaz chromatography - Masse Spectrometry

H

HDAC : Histone deacetylase

HLB : Hydrophilic-lipophilic balance

HPG : Hypothalamo-hypophyso-gonadique

HPLC : Haute performance liquide chromatography

HSA : Albumine sérique humaine

I

IgE : Immunoglobuline E

IgF : Insulin-like growth factor

IgG : Immunoglobuline G

IMC : indice de masse corporelle

L

LH : Hormone lutéinisante

LLE : Liquide-liquide extraction

LMS : Limites de migration spécifiques

LOD : Limit of detection

M

MBzP: Mono benzyle phtalate

MDR : Portail de résistance multidroque

MECPP : Mono (2-ethyl-5-carboxypentyl) phtalate

MEHHP : Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phtalate

MEHP : Mono(2-ethylhexyl) phtalate

MEOHP: Mono (2-ethyl-5-oxohexyl) phtalate

MEP : Mono éthyle phtalate

MMP : Mono méthyle phtalate

MnBP, MBP: Mono butyle phthalate

MSPE : Extraction magnétique en phase solide

MTBSTFA: N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide

N

NHANES : Nutrition examination survey

P

PE : Perturbateurs endocriniens

PET : Polyéthylène téréphtalate

PFBCl : Chlorure de pentafluorobenzyl

PI3K : Phosphoinositide 3 kinase

PKA-CREB : Protein kinase -A cAMP response element-binding protein

PPAR: Peroxisome proliferator activated receptor

PVC : Polychlorure de vinyle

PXR : Récepteur de prégénane-X

R

RAM : Restricted acces media

REACH: Registration, evaluation, autorisation and restriction of chemicals

RfD : Référence dose

RXR : Récepteur X rétinoïque

S

SGH : Système général harmonisé

SIM : Selected ion monitoring

SPE : Solide phase extraction

SPME : Microextraction en phase solide

SXR : Récepteurs stéroïdes et xénobiotiques

T

T3 : Triiodothyronine

T4 : Thyroxine

TDI : Tolérable daily intake

TMSH : Trimethylsulfonium hydroxide

TRPM : Transient receptor potential cation channel, subfamilyM

TSA : Troubles du spectre autistique

U

UE : Union européenne

UHPLC : Ultra haute performance liquide chromatography

US EPA: United states environmental protection agency

V

VTR : Valeurs toxicologiques de référence

Liste des figures

| | |
|--|-------------------------------------|
| Figure 01 : Formule chimique des phtalates..... | 1 |
| Figure 02 : Formule semi développée de la structure générale des phtalates..... | 3 |
| Figure 03 : Nombre d'études sur les sources d'exposition et la contamination environnementale en phtalates (2011) | 10 |
| Figure 04: Métabolisme des Phtalates..... | 13 |
| Figure 5 : Métabolisme de DEHP | 14 |
| Figure 06 : Mécanisme de signalisation moléculaire plausible des phtalates et de leurs métabolites dans la transmission de divers dysfonctionnements chez l'homme..... | 19 |
| Figure 07 : Mécanisme de signalisation moléculaire plausible vis-à-vis de la modulation épigénétique des phtalates et de leurs métabolites..... | 21 |
| Figure 08 : Mécanisme de signalisation moléculaire plausible provoqué par les phtalates et leurs métabolites expliquant les dysfonctionnements dans le système reproducteur féminin. | 22 |
| Figure 09 : Mécanisme de signalisation moléculaire plausible provoqué par les phtalates et leurs métabolites pour expliquer les dysfonctionnements dans le système reproducteur masculin. | 23 |
| Figure 10 : Mécanisme de perturbation de signalisation moléculaire plausible provoqué par les phtalates comme obésogène | 24 |
| Figure 11 : Mécanisme de signalisation moléculaire plausible provoqué par les phtalates expliquent le développement de cancer..... | 25 |
| Figure 12: Procédure d'extraction des métabolites des phtalates | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 13 : Procédure d'extraction des phtalates | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 14: instrument d'analyse la GC-SM..... | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 15 : Répartition de la population selon l'origine géographique..... | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 16 : Répartition de la population selon le sexe | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 17 : Répartition de la population selon l'âge | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 18 : Répartition de la population selon la situation familiale | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 19 : Répartition de la population selon le niveau d'instruction | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 20: Répartition de la population selon Le niveau économique..... | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 21 : Répartition de la population selon l'IMC | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 22 : Répartition de la population selon l'âge de la ménopause..... | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 23 : Répartition de la population selon le statut tabagique | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 24 : Répartition de la population selon les antécédents médicaux | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 25 : Répartition de la population selon l'activité physique ... | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 26 : Répartition de la population selon la nature d'eau à consommée . | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 27 : Répartition de la population selon la consommation journalière de l'eau | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 28 : Répartition de la population selon le type de récipient de conservation | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 29 : Répartition de la population selon la température de conservation d'eau | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 30 : Répartition de la population selon Le lieu de conservation d'eau | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 31 : Répartition de la population selon la réutilisation des bouteilles en plastiques | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 32 : Les taux des apports quotidiens des quatre phtalates | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 33 : La moyenne des taux d'apport quotidien des quatre phtalates selon le sexe | Error! Bookmark not defined. |

Figure 34 : La moyenne des taux d'apport quotidien des quatre phtalates selon l'âge**Error! Bookmark not defined.**

Figure 35 : Les taux de HI TDI et HI RfDAA de la population d'étude..... **Error! Bookmark not defined.**

Figure 36 : Répartition des taux de HI dépassant 1 selon le sexe **Error! Bookmark not defined.**

Figure 37 : Corrélation entre les métabolites des phtalates et l'IMC dans la population d'étude.
..... **Error! Bookmark not defined.**

Figure 38 : L'influence de la conservation d'eau selon les différentes conditions sur la concentration des quatre phtalates **Error! Bookmark not defined.**

Figure 39 : Les taux des phtalates dans les eaux embouteillées selon les différentes conditions
..... **Error! Bookmark not defined.**

Figure 40 : Contribution à la contamination aux DBP et DEHP via l'eau en se basant sur l'apport quotidien de notre population **Error! Bookmark not defined.**

Liste des tableaux

Tableau I: Classification des principaux phtalates selon le poids moléculaire.....2

Tableau II : Propriété physico-chimique des Phtalates :4

Tableau III: Exemple des temps de demi-vie de deux phtalates5

Tableau IV : les différents usages de certains phtalates6

Tableau V: Contribution du couple Milieu/Voie d'exposition à variation de l'ordre de grandeur des doses absorbées..... 11

Tableau VI : Les principaux métabolites des différentes des phtalates ⁽⁴⁹⁾ 15

Tableau VII : Masses caractéristiques des principaux phtalates (70)41

Tableau VIII : Principales colonnes utilisées en GCMS (29).....42

Tableau IX : Températures d'ébullition des principaux solvants utilisés dans l'analyse des (70,76) .43

Tableau X : Comparatif de la classification des substances CMR.....48

Tableau XI : Classification des phtalates en tant que CMR49

Tableau XII : restrictions d'emploi des phtalates dans les matières plastiques51

Tableau XIII : Valeurs de l'apport quotidien tolérable de phtalates établies par l'EFSA51

Tableau XIV: Certains paramètres de la validation analytique de la méthode de dosage des métabolites des phtalates **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XV : Masses et temps de rétention des métabolites de phtalates **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XVI : certains paramètres de la validation analytique de la méthode de dosage des phtalates **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XVII : masses et temps de rétention des métabolites de phtalates **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XVIII : La moyenne de créatininurie..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XIX : la moyenne de la créatininurie selon le sexe **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XX : la moyenne de la créatininurie selon les tranches d'âge **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXI : La moyenne des métabolites de phtalates avec et sans ajustement à la créatininurie
..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXII : Corrélation entre les métabolites avec et sans ajustement à la créatininurie**Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXIII : Corrélation entre tous les métabolites des phtalates après ajustement à la créatininurie..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXIV : La moyenne des phtalates avec ajustement à la créatininurie selon le sexe ...**Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXV : La moyenne des métabolites après ajustement à la créatininurie selon l'âge ..**Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXVI : la moyenne des métabolites des phtalates après ajustement selon L'IMC**Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXVII : les taux de l'apport quotidien en phtalate selon le modèle d'ajustement à la créatininurie..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXVIII: les taux de l'apport quotidien en phtalate selon le modèle volumétrique**Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXIX : Etude de la corrélation entre l'apport quotidien calculé par les modèles volumétrique et ajustement de la créatininurie **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXX : Les taux d'apport quotidien des phtalates en fonction du sexe **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXXI : les taux d'apport quotidien des phtalates en fonction de l'âge ... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXXII : Les taux d'Hazard quotient (HQ)et Hazard index (HI) selon l'ajustement à la créatinine basé sur la TDI..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXXIII : Les taux d'Hazard quotient et Hazard index selon l'ajustement de la créatinine calculée basé sur la RfDAA **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXXIV : Les taux d'Hazard quotient et Hazard index selon le modèle volumétrique basé sur la TDI **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXXV : Les taux d'Hazard quotient et Hazard index selon l'ajustement de la créatinine basé sur par la RfDAA **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXXVI : test de corrélation entre les HI calculé selon le modèle volumétrique et ajustement à la créatininurie **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXXVII : la répartition des taux de HI basée sur la TDI dépassant le seuil en fonction de l'âge **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXXVIII : la répartition des taux de HI basé sur la RfDAA dépassant le seuil en fonction de l'âge..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XXXIX : moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon le niveau d'instruction..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XL : moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon le type d'habitat **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XLI : moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon le niveau de vie **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XLII : moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon le statut tabagique **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XLIII : moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon l'âge de la ménopause..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XLIV : moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon l'activité physique **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XLV : moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon le diabète .**Error! Bookmark not defined.**

Tableau XLVI : Moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon l'HTA**Error! Bookmark not defined.**

Tableau XLVII : Moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon l'asthme **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XLVIII : Moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon les maladies cardiaques..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau XLIX : Moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon le type d'eau consommée..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau L : Moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon la consommation journalière..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LI : Moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon le récipient de conservation d'eau **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LII : Moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon la température de conservation en hiver **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LIII : Moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon la température de conservation en été..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LIV : Moyenne des métabolites phtalates de la population d'étude selon le lieu de conservation..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LV : La moyenne des phtalates dans l'eau embouteillée avant conservation (T0).....**Error! Bookmark not defined.**

Tableau LVI : La moyenne des phtalates dans l'eau embouteillée après exposition pendant un mois au soleil (Ts)..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LVII : La moyenne des phtalates dans l'eau embouteillée après conservation pendant un mois au froid (Tf)..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LVIII : La moyenne des phtalates dans l'eau embouteillée avant et après conservation **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LIX : les taux moyens des phtalates pour chaque marque selon les différentes conditions de conservation **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LX : Apport quotidien en phtalate via l'eau embouteillée .. **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LXI : Hazard quotient via l'eau embouteillée **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LXII: Le pourcentage de la contribution à la contamination aux phtalates via l'eau en se basant sur la TDI..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LXIII : Le pourcentage de la contribution à la contamination aux phtalates via l'eau en se basant sur l'apport quotidien de notre population..... **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LXIV : Risque du cancer due aux phtalate via l'exposition à l'eau (ECR)**Error! Bookmark not defined.**

Tableau LXV : Comparaison des intervalles des taux des métabolites trouvés de notre population avec d'autres études **Error! Bookmark not defined.**

Tableau LXVI : Comparaison des taux des médianes trouvés dans notre étude chez les enfants avec d'autres études **Error! Bookmark not defined.**

Au cours des dernières décennies, diverses études scientifiques ont attiré l'attention sur les effets indésirables de nombreux composés chimiques présents dans l'environnement, regroupés sous le terme général de « perturbateurs endocriniens » (PE). (Diezi, 2009)

L'état des connaissances sur l'impact humain des PE environnementaux est considéré actuellement par les pouvoirs publics comme insuffisant pour prendre des mesures générales d'interdictions à court terme. Cependant, certaines mesures de limitation ont été prises dans des cas particuliers, tels que les phtalates. (Fierens et al., 2012a, Sakhi et al., 2014)

Ces derniers sont des composés chimiques dérivés de l'acide phtalique. Ils sont couramment utilisés depuis les années 1950, comme plastifiants pour assouplir les plastiques, principalement de type le polychlorure de vinyle (PVC). Les phtalates sont présents dans une large gamme de produits de la vie quotidienne. On les trouve dans les produits pour automobile, les revêtements pour les planchers et les murs, les isolants pour câbles et fils souples, le matériel médical, les médicaments, les peintures, les lacs, les encres d'imprimeries, les céramiques et les emballages alimentaires (Fierens et al., 2012a, Dewalque et al., 2014a).

La durée de vie des phtalates est très courte dans l'organisme (quelques heures) et ils sont rapidement métabolisés dans le foie en monoesters qui subissent à leur tour des réactions d'oxydation (dérivés hydroxylés) puis de conjugaison (glucorono-conjugaison) conduisant à leur élimination dans les urines, et dans une moindre mesure dans les selles. Les métabolites ainsi formés, responsables de la toxicité des phtalates, ont également une courte durée de vie dans l'organisme (<24 heures) et sont donc essentiellement éliminés dans les urines. Chez les enfants, un plus fort métabolisme oxydatif conduirait à une plus forte élimination de dérivés oxydés que chez les adultes (Herreros et al., 2013, Anderson et al., 2011)

Les effets des phtalates peuvent aller de la simple allergie au cancer. Les principaux effets qui ont été rapportés dans les études réalisées auprès de différentes espèces animales et chez l'homme sont l'atrophie testiculaire, une atteinte hépatique, une baisse de la fertilité, une diminution du poids fœtal, une augmentation de la masse des reins, une activité anti-androgène ainsi que des effets tératogènes (à des doses très élevées) (Saint-Laurent and Rhainds, 2004, Kayali et al., 2006, Moreira et al., 2014)

Certains phtalates font l'objet d'un classement comme substance à risque reprotoxique (effets néfastes sur la fonction sexuelle et la fertilité ; effets néfastes sur le développement des descendants). Il s'agit du Di(2-ethylhexyl) phtalate (**DEHP**), le Butyl benzyl phthalate

(**BBP**), le Di-iso-butylphtalate (**DIBP**), et le Dibutyl phtalate (**DBP**) qui sont classés Repro2 selon la directive 67/548/CEE et Repro1B selon le règlement 1272/2008. (Cai et al., 2015) En 2012, des nouvelles études ont mis en évidence des effets chez l'être humain notamment un retard de pubertaire chez les filles les plus imprégnées au DEHP et une association entre avortement spontané et le DEHP. Ainsi , une Inhibition de la formation des hormones stéroïdiennes dans le testicule humain aux concentrations environnementales, et obésité infantile était remarquée en cas d'exposition au phtalate de diéthyle (DEP).(Koch et al., 2012)

L'exposition environnementale aux phtalates peut provenir du contact direct avec l'air, l'eau ou via l'alimentation. La libération des phtalates dans ces divers médias est possible en raison du faible lien covalent de ces composés aux polymères.(Domínguez-Morueco et al., 2014)

De nombreuses études ont permis de quantifier cette exposition. Ces études sont groupées en deux types « études indirectes » et « études de biomarqueurs ». Les premières peuvent aider à élucider la source d'exposition en mesurant la concentration des phtalates dans chaque milieu (air, eau, nourriture.....) mais ils sont confrontés à des problèmes de contamination en donnant des valeurs surestimées. Alors que les études de biomarqueurs qui s'intéressent aux métabolites urinaires des phtalates, sont moins sujettes aux problèmes de contamination.(Clark et al., 2011, Dewalque et al., 2014b)

Au cours de cette dernière décennie plusieurs études de biosurveillance des métabolites des phtalates soit dans une population générale soit dans certaines sous-populations spécifiques ont été réalisées.

L'exposition des enfants a fait l'objet de nombreuses études, qui montrent toutes que ces derniers sont davantage exposés que les adultes. Une étude allemande réalisée chez 111 enfants à l'école primaire, a montré une présence de phtalates chez 100 % de ces enfants.(Koch et al., 2011)

D'autre étude a concerné 104 mères et leurs enfants d'âge scolaires dont 18 métabolites de phtalates sur 21 ont été détectés dans les urines, les niveaux les plus élevés étant ceux du DIBP et du DEHP.(Kasper-Sonnenberg et al., 2012)

Une autre étude faite sur les enfants Danois a montré l'exposition de ces enfants à plusieurs phtalates simultanément avec des niveaux plus élevés pour le DBP et le DEHP (action anti-androgénique).(Frederiksen et al., 2011)

Selon l'autorité de sécurité alimentaire européenne (EFSA) la dose journalière tolérable pour les phtalates est de 0,01 mg / kg de poids corporel / jour pour DBP, 0,5 mg / kg de poids

corporel/ jour pour BBP et 0,05 mg / kg de poids corporel/ jour pour DEHP.(Fierens et al., 2012a, Moreira et al., 2014, Clark et al., 2011)

Une étude faite sur une population chinoise où les résultats ont montré un dépassement de la DJA qui est de 10µg/kg/j, proposée par l'EFSA pour le DBP dans 39 % des échantillons.(Guo et al., 2011)

La voie la plus probable de l'exposition humaine est l'alimentation .(Kayali et al., 2006, Moreira et al., 2014). Aujourd'hui, la plupart des aliments sont conditionnés dans des matériaux d'emballage.(Barthélémy et al., 2007)

Selon le Department of Health and Human Services américain (2003), l'ingestion d'aliments ayant été en contact avec des emballages contenant des phtalates demeure la principale source d'exposition pour la population générale.(Rhim et al., 2013, Barlow and Morgan, 2013)

La maîtrise des interactions entre les matériaux d'emballage et les aliments est une préoccupation qui reste très actuelle malgré l'apparition constante de nouveautés dans ce domaine(Pradeau, 2004). Ces derniers temps plusieurs études ont déterminé le taux de contamination de la nourriture par les phtalates. Des chercheurs norvégiens ont déterminé la concentration de dix différents phtalates et du bisphenol A (BPA) dans les aliments et les boissons achetées sur le marché norvégien. Cette étude a montré que les phtalates et BPA se trouvent dans tous les aliments et les boissons analysés. Parmi les différents phtalates, les plus fortes concentrations ont été trouvées pour le DEHP et le DINP(Sakhi et al., 2014).

Deux études ont détecté la présence de phtalates (DEP, DMP, DBP, BBP, DEHP) dans l'eau embouteillée en plastique. Les niveaux retrouvés dépendent de la température ambiante lors du lieu de stockage.

La première en Portugal, cette étude a testé sept marques d'eau embouteillée consommée au Portugal, six en PET et une en verre (la plus consommé). En outre, l'eau du robinet de Lisbonne a été analysée. Le DnBP, le DEHP et le DIBP ont été quantifiés. Seuls trois phtalates ont été détectés dans les eaux potables portugaises : DnBP, DIBP et DEHP. Les concentrations variaient entre 0,06 et 6,5 µg/L pour DnBP, entre 0,02 et 0,16 µg/ L pour les DEHP, et entre 0,1 et 1,89 µg/ L pour DIBP. La concentration de DEHP était cinq fois plus élevée dans l'eau en PET que dans l'eau de la bouteille en verre. Seuls le DIBP et le DEHP ont été détectés dans l'eau du robinet (Santana et al., 2014).

Selon les propriétés physico-chimiques de ces plastiques, des aliments et des conditions de stockage (lumière, température, durée), il se produit des interactions chimiques entraînant

une migration des composés du contenant vers le contenu. (Severin et al., 2011, Barthélémy et al., 2007)

Dans ce contexte, une étude a été menée en Arabie saoudite ; afin de déterminer la présence de phtalates dans les 10 différentes marques d'eau embouteillée disponibles sur les marchés saoudiens et stockés dans des conditions différentes. Le DMP, le DEP, le DBP, le BBP et le DEHP ont été mesurés. La plupart de ces phtalates ont été détectés dans les bouteilles analysées. (Al-Saleh et al., 2011)

En Algérie, l'utilisation du plastique par notre population croît régulièrement ces dernières années. L'omniprésence de ce produit dans notre vie quotidienne et spécialement dans nos produits de consommation, suscite certaines inquiétudes. En l'absence de travaux visant à estimer le taux d'imprégnation des phtalates, une étude dans ce sens s'avère nécessaire pour évaluer les niveaux d'exposition aux phtalates de la population Algérienne.

Le présent travail s'articule autour des axes suivants :

La première partie est une synthèse bibliographique, qui comporte des données générales sur les phtalates, leur mode d'action et leurs effets sur la santé humaine liés à l'exposition chronique de la population générale.

La seconde partie correspond à l'étude pratique reposant principalement sur une évaluation d'une part des taux des métabolites des phtalates dans les urines de la population générale et d'autre part de la contribution des eaux embouteillées à la contamination de la population générale.

Chapitre I : Revue Bibliographique

I. Généralités :

I.1 Définition :

Les phtalates sont un groupe de produits chimiques apparentés du point de vue de leur structure à l'acide phtalique. De ce fait, le mot « Phtalate » dérive du terme acide phtalique lui-même dérivant du mot « Naphtalène ». Ils sont composés d'un noyau benzénique et de deux groupements ester placés en *ortho* d'où la dénomination « esters phtaliques », les groupe R et R' sont des chaînes alkyle variables (Cf. Figure 01).

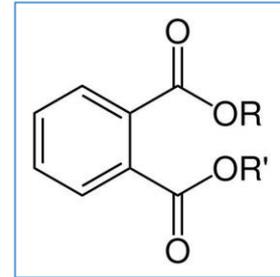


Figure 01 : Formule chimique des phtalates

Il existe un grand nombre de phtalates différents, identifiables selon la longueur de leurs chaînes alkylées. (Almeras et al., 2010, Muczynski, 2011)

I.2 Historique :

Les phtalates sont produits pour la première fois dans les années 1920, ils ont connu un essor très important en 1931. Les phtalates sont très majoritairement utilisés en tant que plastifiants pour rendre le PVC souple et flexible. Ce sont d'ailleurs les plastifiants les plus communément utilisés dans le monde depuis les années 1950. Ils sont également utilisés pour la composition d'autres polymères tels que l'acétate de polyvinyle, l'acétate de cellulose et le polyuréthane. Cependant, au début des années 1990 et depuis l'apparition des problématiques relatives à la santé environnementale, de nombreuses questions sur les effets possibles des phtalates sur la santé humaine se posent. (Bergé, 2012)

I.3 Classification des phtalates :

Les phtalates peuvent être classés selon plusieurs critères relatifs à leur poids moléculaire, à leurs propriétés physico-chimiques ou à leurs effets toxicologiques. (Bergé, 2012, Almeras et al., 2010). Considérant le poids moléculaire des phtalates, on distingue :

- Les phtalates de faible poids moléculaire, dont les chaînes alkyles principales sont inférieures ou égales à C3.
- Les phtalates intermédiaires dont les chaînes alkyles principales contiennent une partie linéaire allant de C4 à C6.
- Les phtalates de haut poids moléculaire dont des chaînes alkyles principales sont cycliques ou contiennent une portion linéaire supérieure ou égale à C7.

Les phtalates les plus utilisés sont classés dans le tableau ci-après. (Zaki, 2015, Saillenfait and Laudet-Hesbert, 2005)

Tableau I: Classification des principaux phtalates selon le poids moléculaire

| Ester de | Abréviation | Nombre de carbone de la chaîne principale |
|--|-------------|---|
| Phtalates de faible poids moléculaire | | |
| Diméthyle | DMP | C1 |
| Diéthyle | DEP | C2 |
| Diallyle | DAP | C3 |
| Di-iso-butyle | DIBP | C3 |
| Phtalates intermédiaires | | |
| Di-n-butyle | DnBP | C4 |
| Butylbenzyle | BBP | C4, C6 |
| Di-n-pentyle | DNPP | C5 |
| Di(2-éthylhexyle) | DEHP, DOP | C6 |
| Di-isoheptyle (chaîne ramifiée) | DIHpP | C5-8 |
| Phtalates de haut poids moléculaire | | |
| Di-cyclohexyle | DCP | C6 |
| Di-n-octyle | DNOP | C8 |
| Di-isononyle | DINP | C9 |
| Di-isodécyle | DIDP | C10 |
| Di-undécyle | DUP | C11 |

I.4 Propriétés physico-chimiques :

Les phtalates ressemblent à l'huile végétale pure, ils sont des liquides visqueux, transparents, incolores, avec peu ou sans odeur et très peu volatils.

Ils confèrent des caractéristiques appréciables aux différents produits de consommation et dans la construction : flexibilité, durabilité, longévité et coût peu élevé.

Ils génèrent par diestérisation de l'acide phtalique et d'alcools à chaînes plus ou moins ramifiées, pouvant aller de C1 à C13 (Cf. figure 02). (Muczynski, 2011)

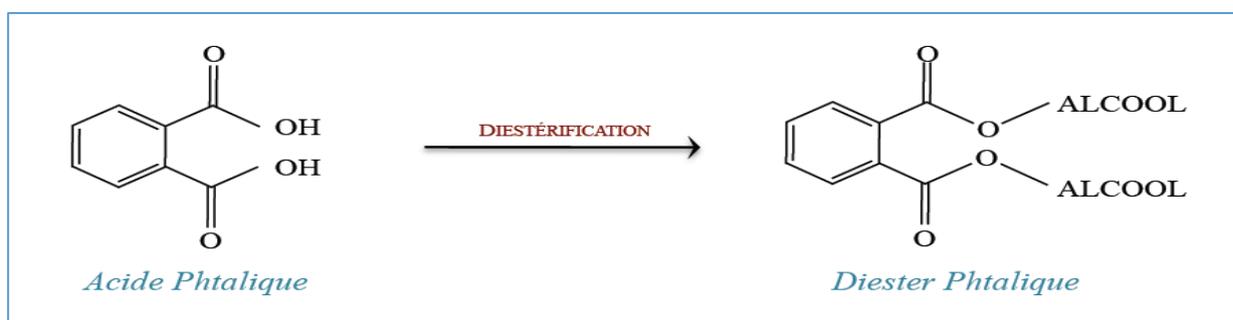
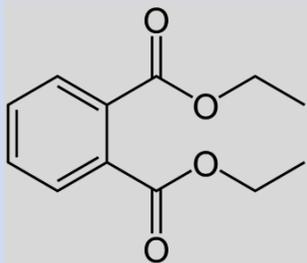
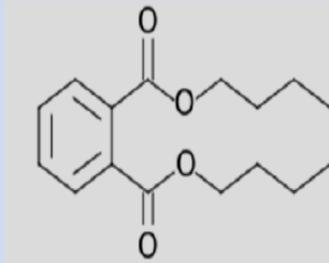
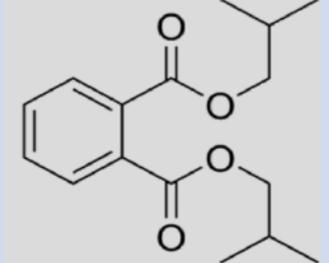
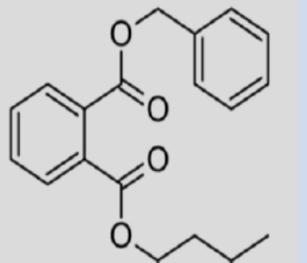
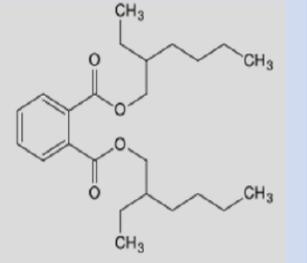


Figure 02 : Formule semi développée de la structure générale des phtalates

Les propriétés physico-chimiques des principaux phtalates sont regroupées dans le tableau II.(Almeras et al., 2010, Lyche et al., 2009)

Tableau II : Propriétés physico-chimiques des Phtalates :

| Substances | DEP | DBP | DIBP | BBP | DEHP |
|-----------------------------|---|--|---|---|---|
| N°CAS | 84---66---2 | 84---74---2 | 84---69---5 | 85---68---7 | 117---81---7 |
| Aspect | Liquide | Liquide | Liquide | Liquide | Liquide |
| | Incolore | Incolore | Incolore | Incolore | Incolore |
| | Huileux | Huileux | Visqueux | Visqueux | huileux |
| Poids moléculaire g /mol | 222,24 | 278,34 | 278,35 | 312,26 | 390,56 |
| Point de fusion (°C) | - 40,5 | -35 | -37 | -40 | -47 |
| Point d'ébullition (°C) | 295 | 340 | 320 | 370 | 386 |
| Tension de vapeur (Pa) | | $3,6 \cdot 10^{-3}$ | | $8 \cdot 10^{-5}$ à 25°C | $1,3 \cdot 10^{-5}$ à 25°C |
| Densité | 1,12 | 1.04 | 1,038 | 1.12 | 0.99 |
| Solubilité dans l'eau | Faible | Faible | Faible | Faible | Pratiquement insoluble |
| Structure |  |  |  |  |  |

I.5 Comportement des phtalates dans l'environnement :

Compte tenu des grandes quantités utilisées, les phtalates sont largement retrouvés dans les différents compartiments de l'environnement, ils figurent d'ailleurs parmi les dix substances les plus souvent quantifiées dans le cadre de l'action de recherche et de réduction des rejets de substances dangereuses dans les eaux. (Almeras et al., 2010)

Le comportement de ces molécules dans les différents compartiments est le suivant :

- Dans l'atmosphère, l'oxydation photochimique est généralement le premier processus de dégradation. Les sous-produits sont éliminés par la pluie.
- Dans le milieu aquatique, en présence d'oxygène, les phtalates se dégradent facilement, par voie biologique, dans les eaux de surface. Cependant, leur biodégradation se trouve considérablement ralentie dans les eaux froides et profondes.
- Dans les sédiments et les sols, la biodégradation est le principal processus de dégradation que ce soit par aérobiose ou anaérobiose. On peut observer une importante absorption des phtalates sur la matière organique des sols, de sorte que leur lixiviation peut être considérée comme faible. (Almeras et al., 2010, Bergé, 2012)

Les temps de demi-vie de ces composés dans les différents compartiments de l'environnement est variable (Cf. Tableau III).

Tableau III: Exemple des temps de demi-vie de deux phtalates

| | Dans l'air | Dans l'eau | Dans le sol | Dans les sédiments |
|------|------------|--------------|-------------|--------------------|
| DEHP | 01 Jour | > 01 semaine | 01 ans | 100 ans |
| DBP | 01 semaine | 01 mois | - | - |

II. Usages et sources d'expositions aux phtalates :

II.1 Usages des phtalates :

On distingue deux grands types d'utilisation des phtalates, sachant que chaque phtalate est susceptible d'être utilisé dans différents types d'usage

II.1.1 Usage en tant que plastifiants :

Depuis 1930, des additifs tels des plastifiants, des lubrifiants et des stabilisateurs thermiques y sont ajoutés afin de donner certaines caractéristiques aux plastiques comme la flexibilité, la résistance à la chaleur et la durabilité. Les plus utilisés sont les phtalates et d'autres composés organiques tels que le bisphénol A. quatre-vingt-dix pourcent de la production de phtalates est destinée aux PVC avec plus de 40% de la composition du PVC flexible est

constituée de phtalates. Ainsi, leur proportion dans certains produits de manipulation quasi-quotidienne peut atteindre 50% (en poids) c'est par exemple le cas des sacs plastiques, des emballages alimentaires, des jouets pour le bain, des dispositifs médicaux et des contenants pour le stockage du sang. (Benjamin et al., 2015a)

II.1.2 Usage dans les produits cosmétiques :

Les cosmétiques sont le deuxième domaine d'application des phtalates où ils sont notamment incorporés comme agents fixateurs afin d'augmenter le pouvoir de pénétration d'un produit sur la peau, ou d'empêcher le vernis de craquer. (Sandra, 2014)

II.1.3 Autres usages :

On trouve également certains phtalates dans plusieurs produits de consommation courante tels que, les adhésifs, les revêtements de sol en vinyle, les huiles lubrifiantes, les condensateurs électriques, les détergents, les solvants, les produits pharmaceutiques, les fils et les câbles électriques (Cf. tableau IV). (Marie et al., 2015)

Tableau IV : les différents usages de certains phtalates

| Phtalate | Types d'usages |
|------------------------------|---|
| Phtalate de benzylbutyle | Fragrances, fixatifs pour cheveux, adhésifs et colles, produits pour l'automobile, revêtement de sol en vinyle. |
| Phtalate de dibutyle | Fragrances, déodorants, fixatifs pour cheveux, vernis à ongle, encres pour imprimante, insecticides, produits pharmaceutiques... |
| Phtalate de diéthyle | Fragrances, déodorants, gels et mousses pour les cheveux, shampooings, savons, fixatifs pour cheveux, vernis à ongle, lotions pour le corps |
| Phtalate de di-2-Éthylhexyle | Fragrances, produits flexibles en PVC (rideau de douche, tuyau d'arrosage, couche, revêtements de sols et toitures, contenant pour la nourriture, film d'emballage alimentaire, sac pour unités de sang, cathéter, tubulure pour soluté, gants, etc.) |
| Phtalate de diisononyle | Produits flexibles en plastiques (utilisé pour remplacer le DEHP dans : les jouets, revêtements de sol, gants, produits d'emballage alimentaires, pailles à breuvage, tuyaux d'arrosage) |
| Phtalate de di-Cyclohexyle | Laboratoires de recherche |
| Phtalate de di-n-octyle | Produits flexibles à base de plastique (revêtements de sols, tuyaux d'arrosage, jouets, gants, chaussures, produits d'emballage alimentaire,...) |
| Phtalate de diméthyle | Déodorants |

II.2 Sources d'exposition aux phtalates :

L'exposition environnementale aux phtalates peut provenir du contact direct avec l'air, l'eau ou encore la nourriture. La libération des phtalates dans ces divers médias est possible en raison du faible lien covalent de ces composés aux polymères. (Gao and Chi, 2015, Fierens et al., 2012c, Dada and Ikeh, 2018)

II.2.1 Contamination des aliments :

II.2.1.1 Apport par migration à partir des matériaux au contact des denrées alimentaires :

La principale voie d'exposition aux phtalates est l'ingestion d'aliments contaminés, en particulier les aliments gras tels que le lait, le beurre et la viande. Les phtalates de bas poids moléculaire (DEP, DBP, BBP) peuvent également être absorbés par la peau, et les phtalates volatils peuvent être absorbés par inhalation. (Fierens et al., 2012b)

L'ingestion est la voie d'exposition la plus courante pour le DEHP.

Les emballages alimentaires en plastique sont une source majeure de contamination en DEHP, ce dernier migre facilement de l'emballage en plastique vers les aliments. (Severin et al., 2011, Yang et al., 2013)

Plusieurs facteurs favorisent la migration des phtalates dans les denrées alimentaires :

- Les substances lipophiles :

Les phtalates présentent une forte affinité pour les graisses et les alcools lourds. Dans le domaine alimentaire, les phtalates contenus dans les emballages peuvent migrer facilement vers les aliments riches en graisses (lait, fromages, viandes, poissons...) d'où les limites de doses imposées par la réglementation. (Bagel et al., 2011, Adeyemi et al., 2009a)

- La surface de contact :

Il existe une relation entre la quantité de phtalate relarguée et la surface de contact entre le matériau et l'aliment. Cependant il n'est pas possible d'affirmer la proportionnalité directe entre ces deux paramètres car les données de la littérature ne sont pas concluantes. (Bagel et al., 2011, Okoli et al., 2014)

- Le temps de contact :

La concentration de DEHP dans un produit alimentaire est directement associée à la date d'emballage avec des concentrations plus élevées de DEHP trouvé dans des aliments emballés à une date antérieure. La quantité de DEHP relarguée augmente avec le temps de contact entre le contenant en PVC et le contenu jusqu'à épuisement de la quantité de phtalate

dans le matériau. Cependant le taux de plastifiant migrant n'évolue pas de façon linéaire dans le temps, il est plus élevé dans le début de contact (Adeyemi et al., 2009b, Barthélémy et al., 2007)

- La température :

L'augmentation de température favorise également le relargage des plastifiants avec une augmentation de 20 à 30% de la quantité de DEHP relarguée dans les lipides lorsque la température passe de 27 à 33 °C. (Barthélémy et al., 2007, Adeyemi et al., 2009b, Okoli et al., 2014)

II.2.1.2 Eaux embouteillées :

Les phtalates sont très peu solubles dans l'eau. (Jiang et al., 2018) Toutefois, certaines études ont montré que l'eau embouteillée destinée à la consommation humaine est susceptible d'être contaminée par des phtalates à cause de la large utilisation de bouteille en plastique de type PET.

À l'échelle nationale, « Les eaux de boisson doivent être préemballées dans des récipients en verre, en polychlorure de vinyl et en polyéthylène téréphthalate, hermétiquement clos et propres à éviter toute possibilité de contamination » selon l'article 14 de l'arrêté du 26 Juillet 2000 relatif aux spécifications des eaux de boissons préemballés.

II.2.2 Produits cosmétiques :

Le contact cutané avec des produits cosmétiques contenant des phtalates est une autre source d'exposition aux phtalates, en particulier le DEP et le DBP. Étant donné que le DEHP n'est généralement pas trouvé dans les produits de soins personnels, sa contamination par cette voie est rare. (Sicińska, 2018)

II.2.3 Autres sources d'exposition :

II.2.3.1 Contamination de l'air :

Le DEHP a une volatilité relativement faible, une quantité très limitée de ce produit chimique peut être pénétrée par inhalation. Cependant, il se lie très facilement aux particules dans l'air et les individus peuvent être exposés au DEHP en inhalant ces particules. Le DEHP peut également se trouver dans l'air intérieur (principalement dans la poussière domestique) à des concentrations beaucoup plus élevées que l'air extérieur (plage de 100 à 1610 mg / g).

Un certain nombre d'études ont montré de fortes corrélations entre les niveaux de diéthyle

phtalate (DEP), phtalate de dibutyle (DBP) et benzylbutyle phtalate (BBP) mesuré dans la poussière de maison et les métabolites urinaires. (Holahan and Smith, 2015, Kashyap and Agarwal, 2018)

II.2.3.2 Jouets en plastiques :

Le DEHP est également ingéré lorsque les enfants mâchent ou mettent des jouets en plastique dans la bouche. Le DEHP peut facilement migrer hors de ces jouets vers la salive, les Concentrations de DEHP dans les jouets en plastique pouvant atteindre 40% (Holahan and Smith, 2015, Gaudin et al.)

II.2.3.3 Nutrition parentérale et dispositif de santé :

Une autre source d'exposition courante est le traitement médical, telles que la transfusion sanguine et la dialyse rénale en utilisant des dispositifs médicaux contenant du DEHP.

Le DEHP se trouve dans les tubes médicaux et des poches de sang à des concentrations très élevées (20–40%) à cet effet les personnes recevant un traitement médical peuvent être exposées à taux élevés de ce produit qui peut être par la suite distribués dans tout le corps. (Bagel et al., 2011, Cirillo et al., 2013)

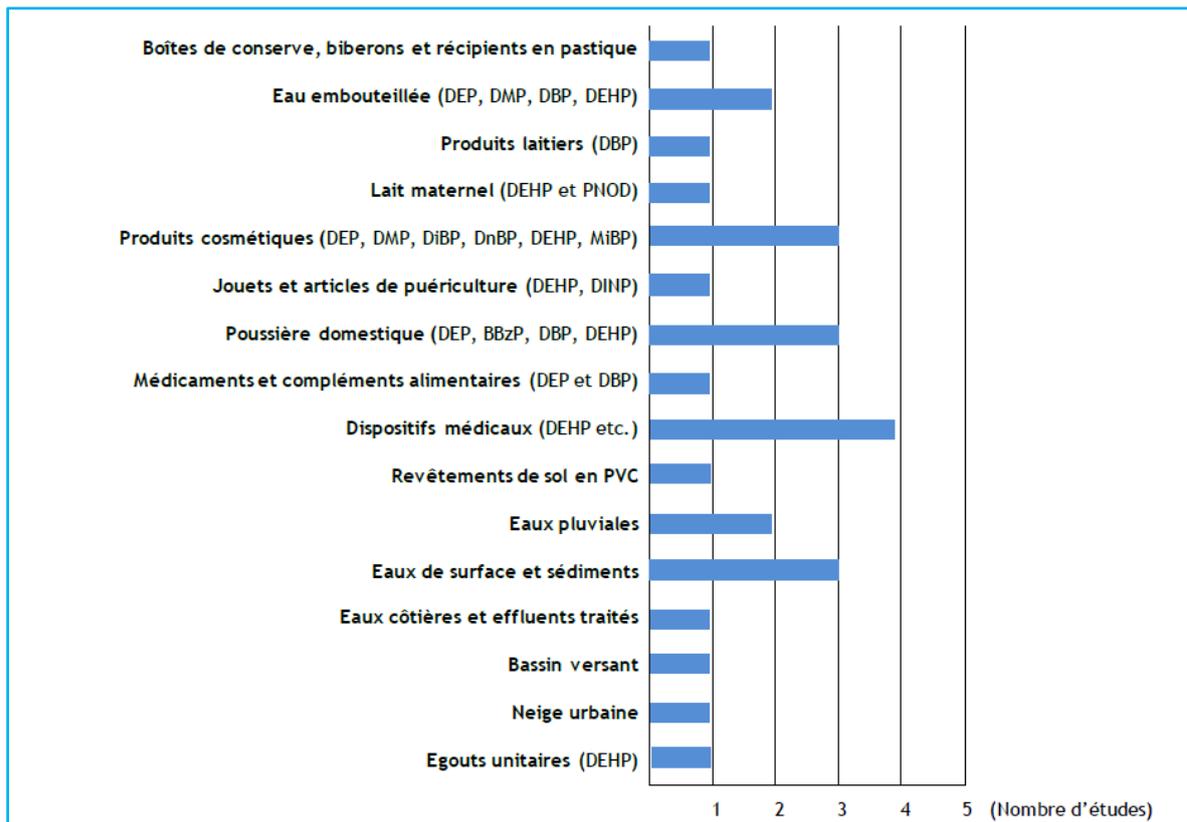


Figure 03 : Nombre d'études sur les sources d'exposition et la contamination environnementale en phtalates (2011)

Les niveaux d'exposition sont variables selon le milieu contaminé, la voie d'exposition et l'âge des personnes exposées (Kashyap and Agarwal, 2018). Le tableau ci-après illustre les variations de ces niveaux. (Sandra, 2014)

Tableau V: Contribution du couple Milieu/Voie d'exposition à variation de l'ordre de grandeur des doses absorbées.

| Voie d'exposition | Milieux contaminés | L'ordre de grandeur des doses absorbées(/kg/j). |
|---|--------------------|---|
| Exposition des adultes et des enfants âgés de plus de 03 ans | | |
| Inhalation | Air et vapeur | ng |
| | Poussières | 10 ^{ème} de ng |
| Ingestion | Aliments | µg |
| Cutanée | Cosmétiques | Pas de données |
| | Sol | Pas de données |
| Exposition des enfants âgés de moins de 03 ans | | |
| Inhalation | Air et vapeur | ng |
| | Poussières | ng |
| Ingestion | Aliments | µg à la 10 ^{ème} de µg |
| | Jouets | 100 ^{ème} de µg |
| Cutanée | Jouets | µg |
| | Sol | Pas de données |

III. Toxicocinétique des phtalates :

Des observations toxicocinétiques ont été réalisées pour les différentes voies d'exposition (ingestion, inhalation et cutanée) pour différentes espèces. Peu de données sont disponibles pour l'Homme et parfois, les résultats obtenus à partir d'études menées sur les animaux ne sont pas extrapolables à l'Homme. (Kumar and Sivaperumal, 2016)

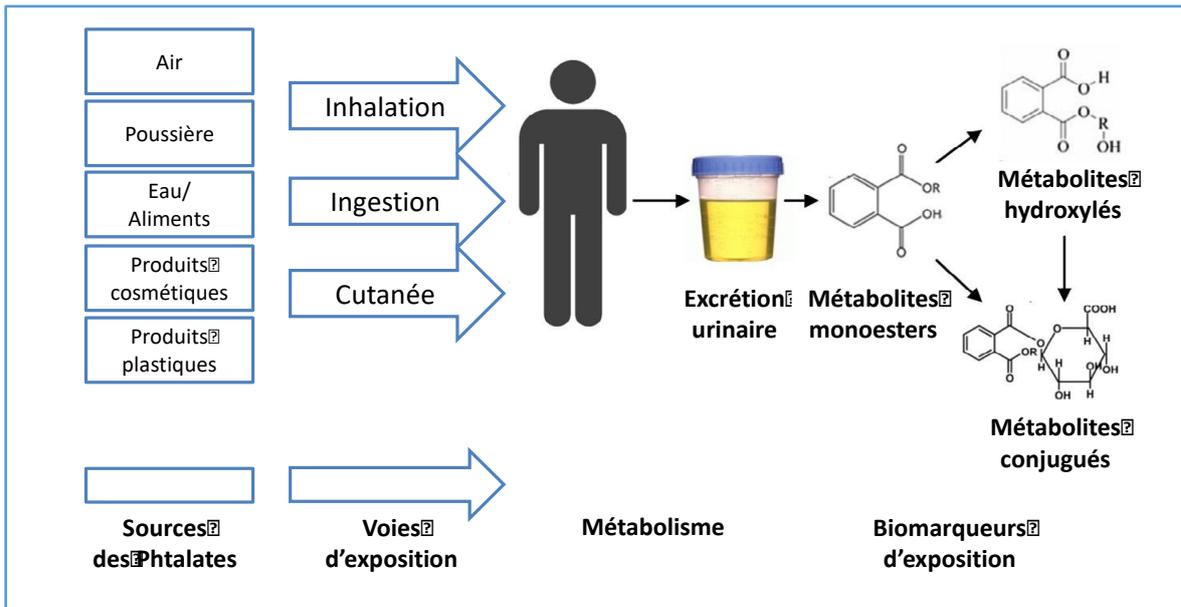


Figure 03 : sources d'exposition aux phtalates

III.1 Absorption :

III.1.1 Phtalates introduits par voie orale :

Il est généralement admis qu'après administration par voie orale, les phtalates sont intensément hydrolysés par des estérases non spécifiques présentes dans le tissu intestinal, et presque intégralement absorbés sous la forme de monoesters. Ces estérases agissent également sur d'autres tissus tel le foie. Les études menées sur le rat montrent que la dose ingérée est très rapidement absorbée par le tractus gastro-intestinal. Jusqu'à 50% des doses ingérées peuvent être absorbées. Cependant, les études menées sur l'Homme montrent que l'absorption est plus lente que chez le rat. (Johns et al., 2015, Holahan and Smith, 2015)

III.1.2 Phtalates introduits par voie respiratoire :

L'inhalation est une voie peu étudiée. Peu de données sont disponibles. Seules quelques-unes existent et montrent qu'une absorption sous forme d'aérosol est possible. (Almeras et al., 2010)

III.1.3 Phtalates introduits par voie cutanée :

Les études chez le rat montrent que l'absorption cutanée est limitée. De plus, des études comparatives in vitro ont montré que l'absorption cutanée chez l'homme est encore plus faible que chez le rat. Entre 2 et 5% seulement de la dose appliquée est absorbée. (Holahan and Smith, 2015)

III.2 Distribution :

Une fois absorbés, les mono-esters sont distribués dans différents tissus, sans qu'aucune accumulation ne soit observée. La plupart des phtalates ont pour organe cible le foie. Ensuite, les monoesters subissent une succession de réactions enzymatiques. (fig 03) (Almeras et al., 2010)

III.3 Métabolisme :

Dans l'organisme, les diesters d'acide phtalique sont rapidement métabolisés au cours d'une succession de réactions enzymatiques. On distingue deux réactions majeures. Lors de la réaction de phase I, le diester de phtalate est hydrolysé au niveau d'une des chaînes carbonées de sa structure en monoester, produisant de ce fait son monoester primaire correspondant (Cf. Figure 04). Ces métabolites primaires sont considérés comme les composés biologiquement actifs des diesters respectifs. Cette première phase de métabolisation a lieu majoritairement au niveau de l'intestin et de différents organes parenchymateux et est catalysée par des lipases et estérases. (Muczynski, 2011, Ventrice et al., 2013)

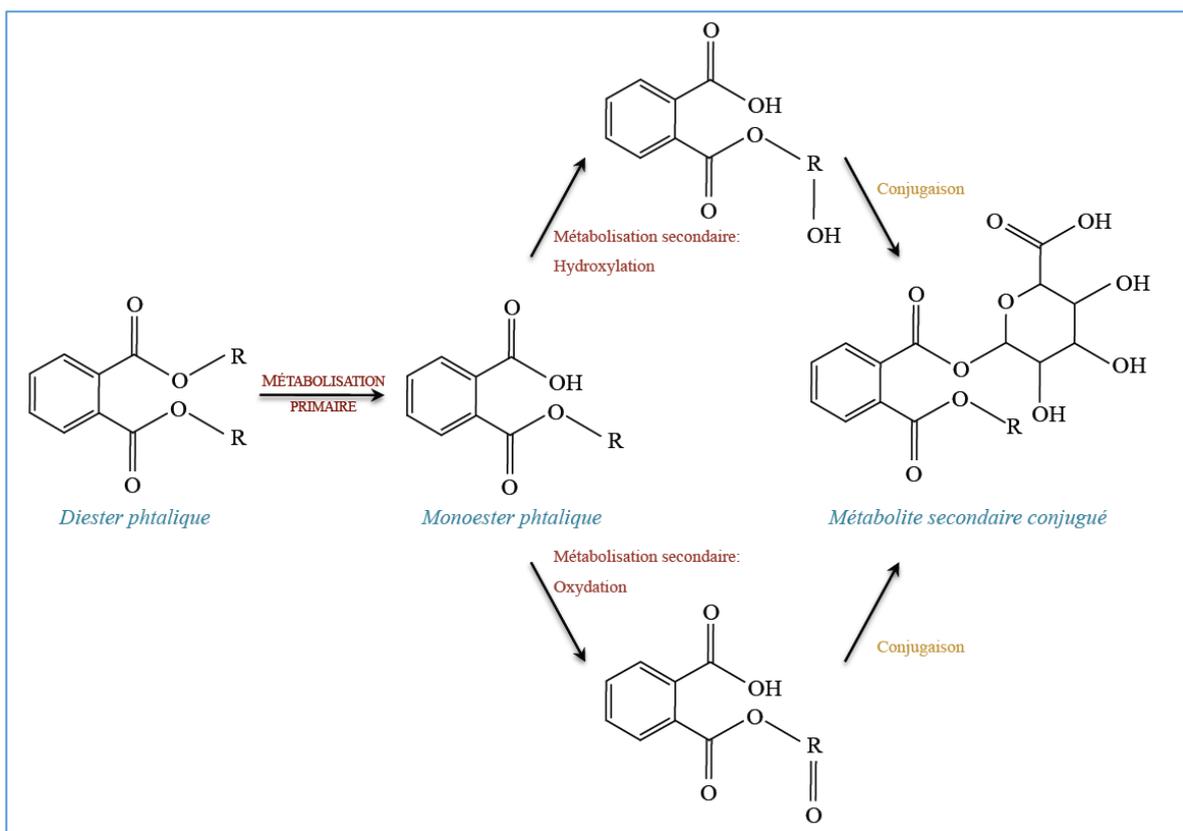


Figure 04: Métabolisme des Phtalates(Kumar and Sivaperumal, 2016)

Les phtalates à courtes chaînes relativement polaire ainsi que les phtalates à ramifications courtes (nombre de carbone < 8), tels que DMP, DEP, DnBP, DiBP sont rapidement hydrolysés en monoesters. (Kumar and Sivaperumal, 2016, Frederiksen et al., 2007)

Les diesters à longues chaînes comme le di (2-éthylhexyl) phtalate (DEHP) contrairement aux phtalates à courtes chaînes subissent une série de métabolisations secondaires aboutissant à des monoesters secondaires.

La première étape de métabolisme du DEHP est catalysée par des lipases non spécifiques localisées au niveau de l'intestin et du pancréas. Cette réaction rapide d'hydrolyse conduit à la formation de deux métabolites primaires, le Mono-2-éthylhexyl phtalate (MEHP) considéré comme le métabolite actif du DEHP et le 2-éthylhexanol. Le MEHP peut ensuite subir une série de transformations biochimiques composées d'hydroxylations et d'oxydations de la chaîne aliphatique amenant à la synthèse des différents métabolites secondaires du DEHP. Il existe environ une quinzaine de métabolites secondaires du DEHP dont les principaux sont le mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate, le mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate, le mono-2-éthyl-5-carboxypentyl phtalate et le mono-2-carboxyméthylhexyl phtalate. (Muczynski, 2011)

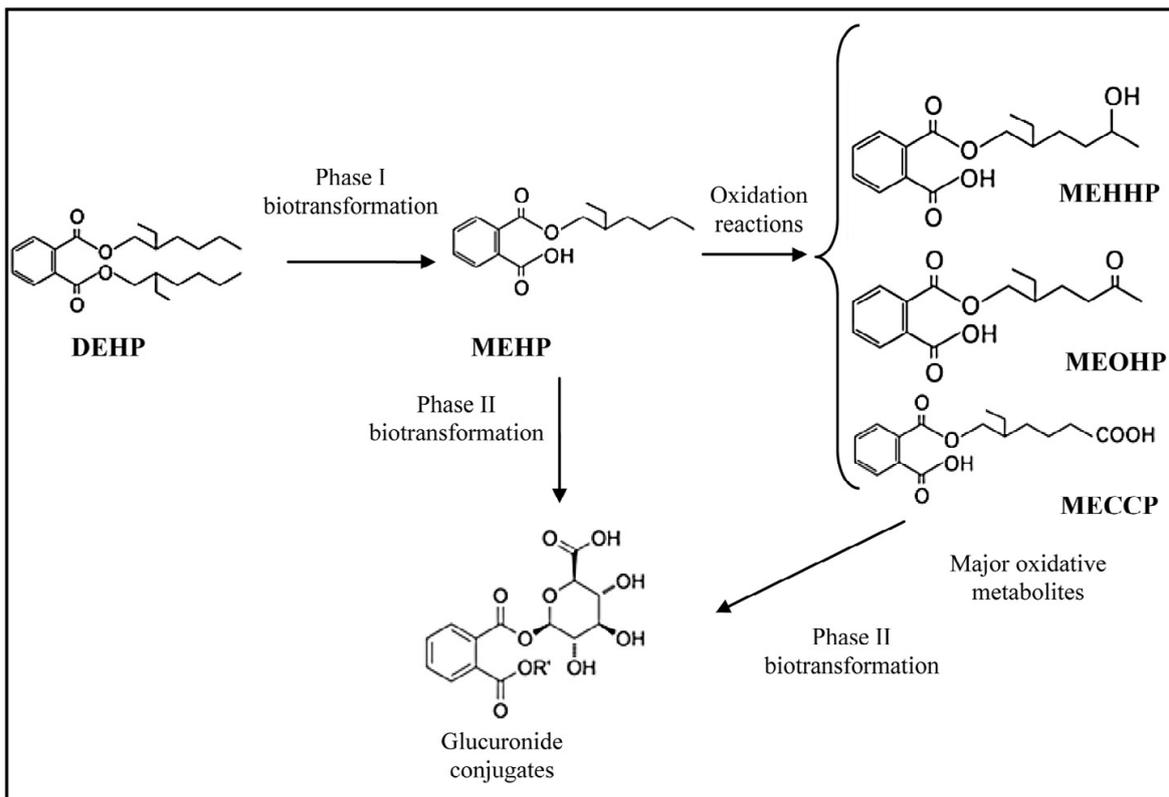


Figure 5 : Métabolisme de DEHP (Kumar and Sivaperumal, 2016)

Le tableau ci-après liste les principaux phtalates avec leurs métabolites respectifs.

Tableau VI : Principaux métabolites des différentes des phtalates ⁽⁴⁹⁾

| Substance | Abréviation | Métabolite |
|-----------------------------|-------------|---|
| Dimethylphthalate | DMP | - |
| Diethylphthalate | DEP | Monoethylphthalate |
| Diallylphthalate | DAP | - |
| Di-n-propylphthalate | DPropP | - |
| Di-n-butylphthalate | DnBP | Mono-n-butylphthalate |
| Di-isobutylphthalate | DiBP | Mono-isobutylphthalate |
| Di-n-pentylphthalate | DnPP | Mono-n-pentyl phthalate Mono-(4-hydroxypentyl)phthalate |
| Di-isopentylphthalate | DiPP | Mono-isopentylphthalate |
| Dicyclohexylphthalate | DcHP | - |
| Benzylbutylphthalate | BzBP | Monobenzylphthalate |
| Di-2-ethylhexyl phthalate | DEHP | -Mono(2-ethylhexyl)phthalate -Mono(2-ethyl-5-oxohexyl)phthalate -Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalate -Mono(2-carboxymethylhexyl)phthalate -Mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalate |
| Di-n-octylphthalate | DnOP | Mono-n-octylphthalate |
| Diphenylphthalate | DPheP | - |
| Di-isononylphthalate | DiNP | -Mono-isononyl phthalate -Mono(4-methyl-7-hydroxy-octyl)phthalate -Mono-(4-methyl-7-oxo-octyl)phthalate -Mono(4-methyl-7-carboxy-heptyl)phthalate |
| Di-isodecylphthalate | DiDP | -Mono(4,5-dimethyl-7-oxooctyl)phthalate -Mono(4,5-dimethyl-7-hydroxyoctyl)phthalate -hMono(4,5-dimethyl-7-carboxy-heptyl)phthalate |
| Di-decylphthalate | DnDP | - |
| Di-2-propylheptyl phthalate | DPHP | - |
| Di-2-ethylhexyl adipate | DEHA | - |

III.4 Élimination :

L'excrétion est rapide, elle se fait principalement par voie urinaire et parfois par voie fécale. Les métabolites urinaires sont éliminés sous formes libre ou glucuroconjuguées.

Le DMP et DEP sont principalement excrétés dans l'urine sous forme de monoesters non conjugués ; monométhyle phtalate (MMP) et monoéthylphtalate (MEP).

Dans l'urine humaine, environ 70% de MEP est non conjugué (Kumar and Sivaperumal, 2016, Frederiksen et al., 2007)

Le DnBP et le DiBP, selon l'étude faite par *Lorber et Koch*, ces deux composés sont fortement métabolisés et éliminés après 24h dans les urines de l'ordre de 92,2% et 90,3% respectivement juste une quantité minime (<1%) est excrété après 48h. Les monoesters représentent leurs principaux métabolites à savoir le mono-n-butyl phtalate 84% et le mono-isobutylphtalate 71% pour DBP et DiBP respectivement (Lorber and Koch, 2013)

Néanmoins le mono-3hydroxybutyl phtalate et le mono-4 hydroxybutyl phtalates sont des métabolites de DBP à pourcentage faible 8,2 et 2% respectivement.

Pour le DiBP, en plus de son principal métabolite on peut le trouver dans les urines sous forme de 3OH-mono-isobutylphtalate et 2OH-mono-isobutylphtalate. (Lorber and Koch, 2013)

Concernant le BBzP, le principal métabolite est le mono-butyl benzyl.

Par voie orale, l'élimination du BBzP inchangé ou de ses métabolites est rapide et quasiment totale (73% à 84% en 24h) principalement dans les urines le mono-benzyl- phtalates et le mono-butyl phtalate sont retrouvés dans les urines en grande majorité sous forme conjuguée ; seuls 6 à 7% sont présents sous forme libre. (INRS, 2017)

Dans une étude faite sur des volontaires, 67% de DEHP est excrété dans les 24h alors que 3,8% peut être excrété dans les 48h après absorption d'une seule dose. Au niveau du plasma le principal composé trouvé est le MEHP (Frederiksen et al., 2007)

Ils existent environ une quinzaine de métabolites secondaires du DEHP dont les principaux sont le 5-ox-MEHP et le 2-oxo-MMHP qui ont une demi-vie plus longue que celle de MEHP, ce qui les rend des biomarqueurs de choix pour l'évaluation de l'élimination en temps réel du DEHP tandis que le 5-OH-MEHP et le 5-oxo-MEHP sont des excellents biomarqueurs de l'évaluation de l'exposition à court terme du DEHP (Ventrice et al., 2013)

IV. Toxicité des phtalates :

IV.1 Mécanisme d'action toxique :

Les phtalates ne sont pas irritants pour la peau, les yeux et les voies respiratoires. Ils ne sont pas non plus allergisants. Des effets sur le foie, les reins et le système reproducteur ont été observés après une administration chronique, les effets varient d'un phtalate à un autre. (Almeras et al., 2010)

IV.1.1 Mécanisme d'action moléculaire :

Les effets sur le foie sont communs à tous les phtalates. Chez les rongeurs, une prolifération des peroxyosomes pouvant mener à des tumeurs hépatiques. Les récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) sont à l'origine de la prolifération des peroxyosomes et des hépatocytes. Il a été suggéré que la formation de tumeurs hépatocellulaires chez les rongeurs exposés est attribuable à des mécanismes auxquels l'espèce humaine est beaucoup moins sensible. Le mécanisme à l'origine de l'apparition des tumeurs hépatiques chez les rongeurs n'est donc pas transposable à l'homme. (Almeras et al., 2010)

Des preuves solides du mécanisme de perturbation endocrinienne des phtalates sont fondées par l'intermédiaire des PPAR, les principaux récepteurs nucléaires ; qui régulent la transcription des gènes cibles (Benjamin and Spener, 2009).

Les récepteurs nucléaires sont généralement regroupés en trois catégories :

(a) : les récepteurs hormonaux classiques qui se lient à des ligands ou agonistes spécifiques (par exemple, les androgènes, les œstrogènes, la progestérone, la thyroxine, les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, etc.);

(b) : les récepteurs orphelins dépourvus de ligands connus- ils sont donc orphelins, mais représentent des récepteurs potentiels pour de nouvelles hormones ou ligands ;

(c) : des récepteurs non spécifiques [par exemple, PPAR, récepteur de prégnane-X (PXR), récepteur androstannique constitutif (CAR), récepteur X du foie (LXR), AhR, etc.] y compris leurs variantes d'épissage, ces récepteurs seraient reconnus par des ligands hétérogènes, qui traversent la voie métabolique.

D'autre part PPAR, PXR et CAR agissent comme des capteurs xénobiotiques (y compris les phtalates), déclenchant des réponses transcriptionnelles adaptatives liées au métabolisme xénobiotique (Benjamin et al., 2015a, Kim and Park, 2014, Benjamin et al., 2015b, Desvergne et al., 2009, DeKeyser et al., 2011, Mullur et al., 2014)

Sur la base des études expérimentales, le mécanisme suivant pour la signalisation nucléaire impliquant les phtalates est proposé :

- Les phtalates hydrophobes comme le phtalate-FABP ou le phtalate -HSAcomplex sera ciblé sur les récepteurs hormonaux sur le transporteur membranaire glandsor. Ce complexe est facilement transporté à travers la membrane liée au récepteur ou le transporteur vers le cytoplasme ; de là pénètre facilement dans le nucléoplasme (probablement à travers le pore nucléaire); par la suite, le composant phtalate en tant que co-activateur est transféré du support et se trouve lié à la protéine réceptrice nucléaire appropriée (PPAR ou PXR ou CAR) résidant dans le nucléoplasme. Ce complexe phtalate-PPAR orphtalate-PXR ou phtalate-CAR ou de tels complexes seront probablement hétérodimérisés avec l'acide RXR-acide rétinoïque. Cet hétérodimère en tant que facteur de transcription se liera à l'amont du groupe cible responsable de la biosynthèse des hormones et à ceux impliqués dans le métabolisme xénobiotique, en particulier le système du cytochrome P450. Par conséquent, les gènes cibles seront exprimés ou surexprimés (par l'effet mimant des phtalates comme ligand naturel de l'hormone) ou supprimé ou déprimé (la régulation à la baisse). (Sarath Josh et al., 2016)
- Dans ce mécanisme plausible, et en utilisant l'approche in silico, il a été démontré que les deux formes des phtalates (les monoesters ou diesters) peuvent se lier sur ces récepteurs, surtout les monoesters avec les récepteurs PPAR / RXRs (Sarath Josh et al., 2014), PXR , les œstrogènes et les kétrostéroïdes. Cependant, d'autres preuves d'études mécanistiques in vitro et précliniques in vivo sont nécessaires pour étayer ce modèle. (Benjamin et al., 2017)

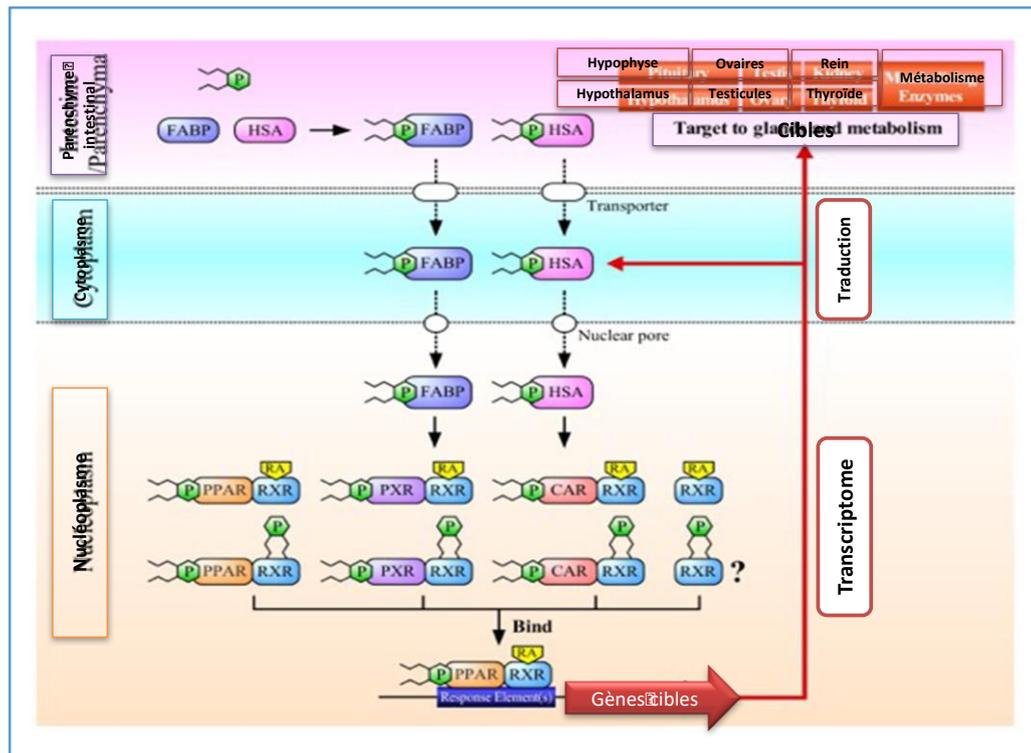


Figure 06 : Mécanisme de signalisation moléculaire plausible des phtalates et de leurs métabolites dans la transmission de divers dysfonctionnements chez l'homme. Abréviations : FABP (protéine de liaison aux acides gras); HSA (albumine sérique humaine); P (phtalate et ses métabolites); PXR (récepteur de prégnane-X), CAR (récepteur constitutif d'androstane), PPAR (récepteur activé par les proliférateurs de peroxyssomes); RXR (récepteur X rétinoïque); RA (acide rétinoïque).

IV.1.2 Modulation Epigénétique :

Le DEHP a été intensivement étudié en ce qui concerne son impact sur l'hérédité épigénétique et les maladies qui apparaîtront à l'âge d'adulte, tandis que le DBP et le BBzP sont les phtalates les moins fréquemment étudiés. La génotoxicité des phtalates interviendrait généralement par la méthylation, la déméthylation et l'altération de la chromatine par le biais de l'histone dans les régions promotrices de l'empreinte génétique (Fig 7).

Les phtalates peuvent se lier aux queues d'histones, altérant ainsi l'étendue de l'ADN qui l'entoure et la disponibilité des gènes à désactiver. (Manikkam et al., 2013, Wu et al., 2010). La méthylation ou la déméthylation de l'ADN et la condensation de la chromatine au niveau de la région promotrice des gènes critiques par le biais de changements dans l'histone et la phosphorylation des protéines exprimées sont les principales modifications épigénétiques conférées par les phtalates.

Pendant la méthylation, les groupes méthyle peuvent marquer la base de la cytosine. Ces groupes méthyliques se projetteraient dans le sillon principal de l'ADN et inhiberaient la transcription. Le processus de déméthylation est nécessaire à la reprogrammation épigénétique des gènes est également directement impliqué dans de nombreux mécanismes

pathologiques importants tels que la progression tumorale et le diabète (Rajesh and Balasubramanian, 2014).

Les phtalates prédisposent aux dysfonctionnements glucométaboliques à l'âge adulte dans les générations suivantes, en altérant la fonction des gènes critiques . L'exposition maternelle au DEHP chez la souris a montré une dysfonction testiculaire médiée par une hyperméthylation de l'ADN conduisant à une inhibition du fonctionnement de l'insuline like-3, le gène critique pour la production de testostérone .(Wu et al., 2010)

D'autre part, il a été démontré que le DEHP et le DBP influencent fortement les maladies d'apparition tardives, y compris les anomalies pubertaires, les maladies ovarienne (insuffisance ovarienne polykystique et primo-ovarienne), le dysfonction testiculaire et l'obésité par hérédité transgénérationnelle épi-génétique chez le rat (Manikkam et al., 2013).

Les phtalates comme le DBP peuvent induire une hypométhylation de l'ADN au niveau de la région riche en CpG du promoteur du gène c-myc dans le foie du rat par l'activation des PPAR, favorisant ainsi le cancer (Kostka et al., 2010). En utilisant la technique de transplantation spermatogonale chez la souris, il a été démontré que le DEHP diminuait le nombre de spermatozoïdes et sa motilité jusqu'à la génération F4 en perturbant l'organisation testiculaire et les cellules souches spermatogoniques. La différenciation sexuelle peut également être dérégulée par l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade par la régulation épigénétique des gènes de la granuline et du gène p130 . Chez l'homme, l'exposition prénatale aux phtalates, dont le DEHP, a fortement déméthylé les gènes IgF₂ exprimés paternellement et les gènes H19 exprimés maternellement, qui jouent un rôle crucial dans la croissance embryonnaire et placentaire.(Benjamin et al., 2017)

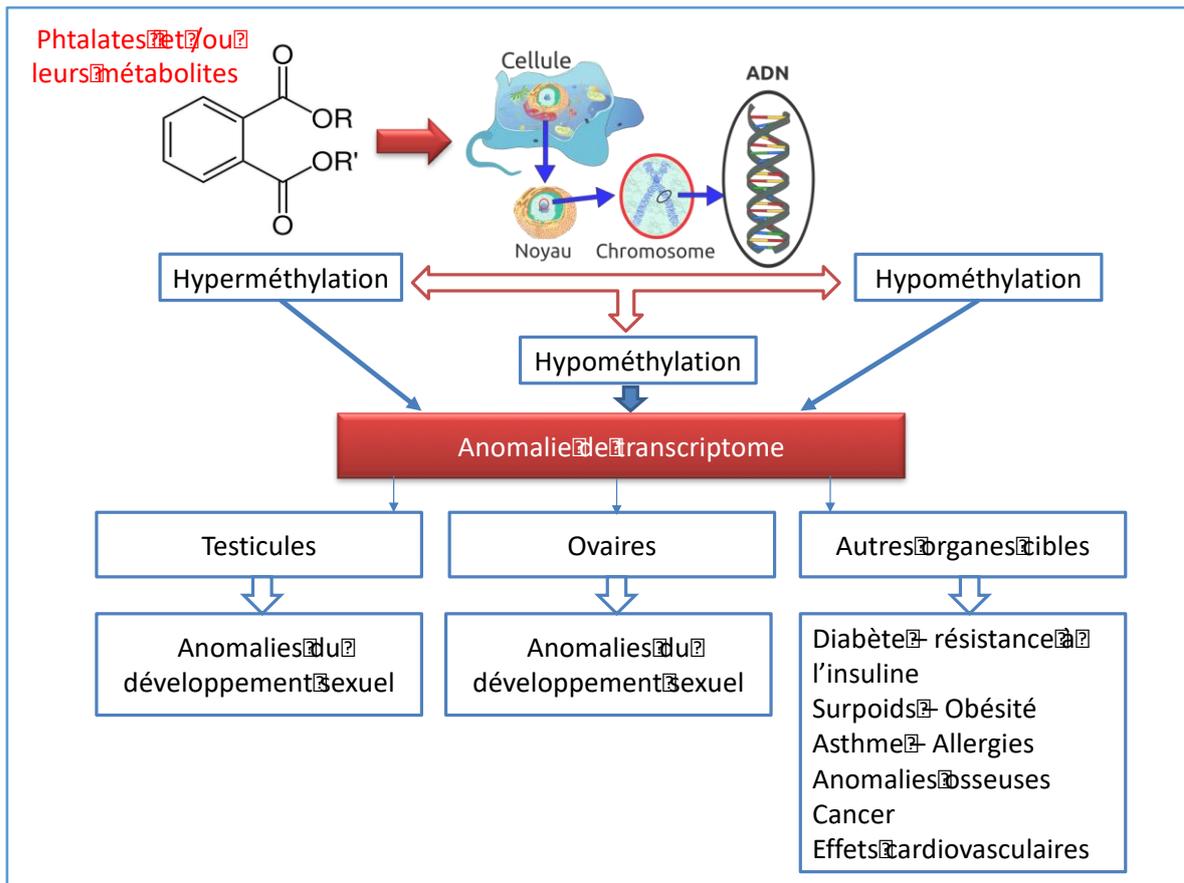


Figure 07 : Mécanismes de signalisation moléculaire plausible vis-à-vis de la modulation épigénétique des phtalates et de leurs métabolites

IV.1.3 Mécanisme d'action des phtalates chez la femme :

Les esters de phtalates et leurs métabolites, en particulier les monoesters correspondants, agissent comme agonistes et / ou antagonistes en interagissant simultanément avec un ou plusieurs récepteurs hormonaux (Shanle and Xu, 2011) un réseau de croisements moléculaires, de sorte que la perturbation des liens dans ce réseau affecterait le bon fonctionnement de l'ensemble du système humain (Fig.8). Par exemple, l'élévation induite par le DEHP dans les niveaux de testostérone et E2 sérique chez le rat suggère l'existence de multiples croisements entre les récepteurs des androgènes, des œstrogènes et d'autres hormones stéroïdes (Akingbemi et al., 2004). Pour une interaction correcte avec les récepteurs, les phtalates nécessitent une certaine taille de maintien et l'encombrement de la chaîne alkyle, plusieurs diesters de phtalates avec la chaîne alkyle C3-C6 ont inhibé les activités contrastées comme les activités œstrogéniques à médiation hER et les activités anti-œstrogéniques à médiation hER d'une manière dose dépendante. D'autre part, les phtalates complexés avec du PPAR interagiraient avec les hormones folliculo-stimulantes, essentielles au développement pubertaire et à la fonction des ovaires féminins en inhibant la production

d'estradiol, en supprimant l'activité de la théomatase dans les cellules de la granulosa par une diminution de la signalisation de l'AMPC. L'effet combiné des phtalates a un risque plus important pour l'homme car il déclencherait simultanément plusieurs voies, incluant la synthèse et le métabolisme des ERS et des hormones thyroïdiennes. Cet effet montre que les phtalates peuvent modifier l'activité génomique et non génomique du système reproducteur féminin directement par le biais d'interactions avec les RE, ou indirectement en tant que régulateurs ou co-activateurs des facteurs de transcription comme les PPAR ou le récepteur aryl-hydro-carbone (AhR), ou encore par une voie indépendante en modulant les enzymes métaboliques critiques pour le métabolisme des ER. (Benjamin et al., 2017)

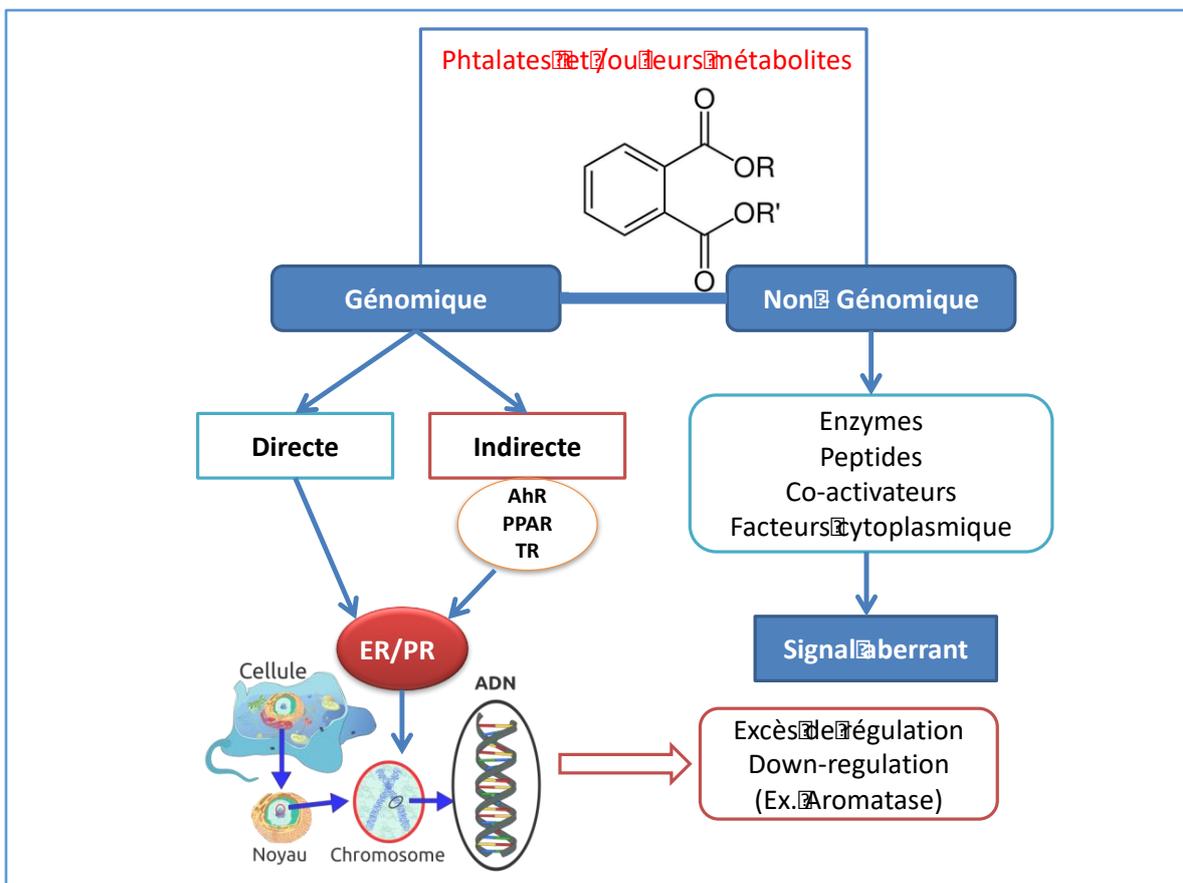


Figure 08 : Mécanismes de signalisations moléculaires plausible provoqué par les phtalates et leurs métabolites expliquant les dysfonctionnements dans le système reproducteur féminin.

Abréviations : AhR (récepteur d'hydrocarbure aryle), PPAR (récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes), TR (récepteur thyroïdien), ER (récepteur des œstrogènes) et PR (récepteur de progestérone).

IV.1.4 Mécanisme d'action des phtalates chez l'homme :

L'effet délétère des phtalates sur le développement des testicules fœtale et la mise en place de la fonction de reproduction masculine ne sont plus à démontrer chez les rongeurs, les mécanismes moléculaires qui en sont responsables sont à l'heure actuelle très mal connus. Un certain nombre de données ont néanmoins permis d'établir quelques hypothèses quant à

leurs modes d'action. L'impact des phtalates sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (axe HPG) pourrait jouer un rôle critique dans les systèmes reproductifs et immunitaires (Pocar et al., 2012) avec l'implication de voies multiples dans le maintien de l'homéostasie stéroïdienne et la biosynthèse des hormones stéroïdes (Fig.9). Les études épidémiologiques et expérimentales chez l'animal ont montré que le syndrome de dysgénésie testiculaire se produit en raison de l'altération de fonction des cellules de Sertoli (inhibant la progression de la méiose pendant la spermatogenèse et la spermogénèse)(Uren-Webster et al., 2010)et l'inhibition de la production de testostérone (produit de la cellule de Leydig) par suppression du facteur de croissance analogue à l'insuline like 3 (Igf-3) (Ge et al., 2007). Une hyperplasie des cellules de Leydig a été observée. Elle est due à l'expression accrue des protéines comme TRPM-2 et Bcl-2 et de la régulation négative du récepteur c-kit (cruciale pour le développement et le fonctionnement testiculaire). (Benjamin et al., 2017)

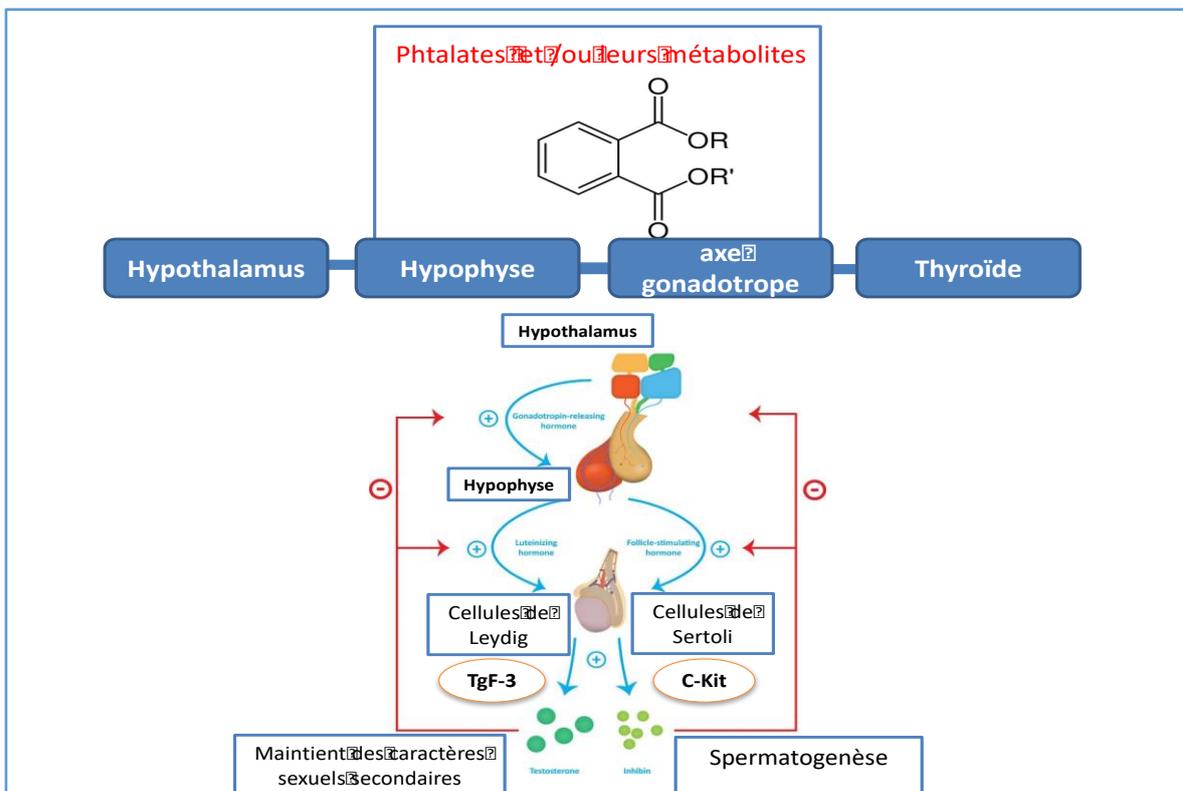


Figure 09 : Mécanisme de signalisation moléculaire plausible provoqué par les phtalates et leurs métabolites pour expliquer les dysfonctionnements dans le système reproducteur masculin.

IV.1.5 Mécanisme d'action des phtalates et obésité :

Le surpoids et l'obésité induits par les phtalates peuvent être provoqués par de multiples mécanismes. Ils sont dus principalement à la perturbation de la signalisation moléculaire impliquée dans le métabolisme lipidique et son homéostasie. Cette signalisation nucléaire perturbée peut passer par l'hypothalamo-hypophyse-gonade / thyroïdie couplée à des

facteurs de transcription nucléaire comme PPAR, qui peuvent être résumés comme suit : (a). phtalates-PPAR - canal androgène; (b) canal phtalate-hormone thyroïdienne ; (c). Phtalate-PPAR -adipogenèse ; et (d). Canal de modulation phénotype-épigénétique économe (Fig.10). (Benjamin et al., 2017)

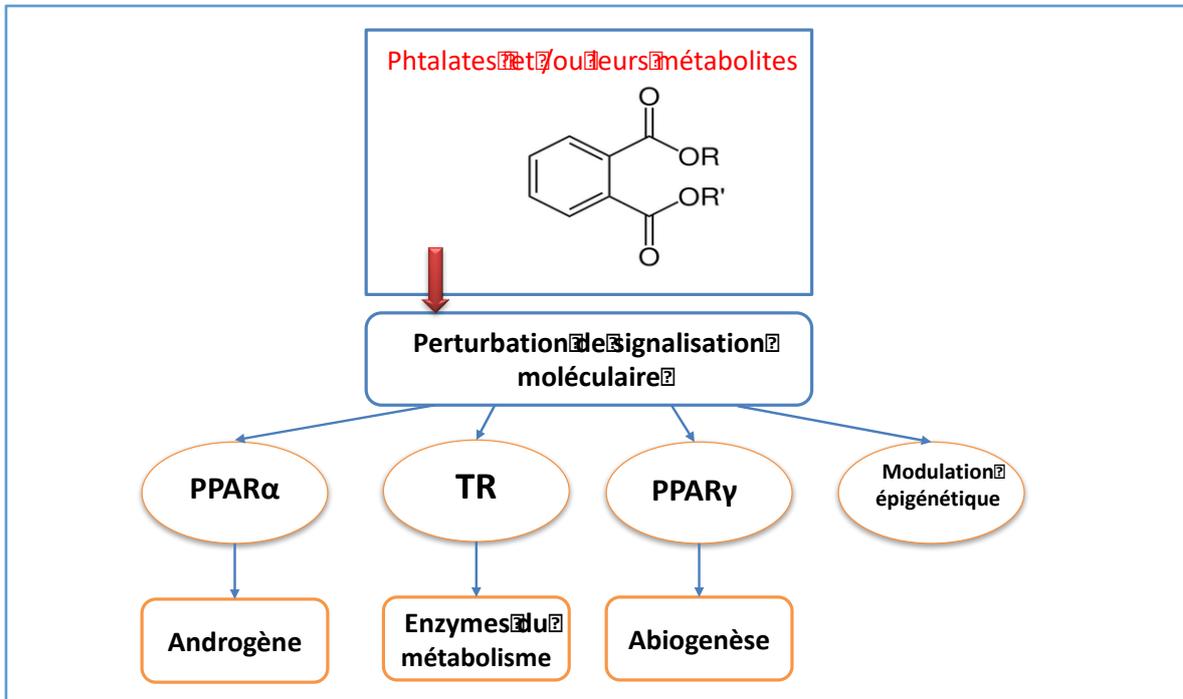


Figure 10 : Mécanisme de perturbation de signalisation moléculaire plausible provoqué par les phtalates comme obésogène

IV.1.6 Mécanisme d'action des phtalates et cancer :

Les données d'études animales et in vitro ont mis en lumière le mécanisme d'induction du cancer par les phtalates, en particulier le carcinome hépatique et du sein. Les phtalates peuvent être transportés dans les cellules via le canal MDR1 par la régulation transcriptionnelle des récepteurs stéroïdes et xénobiotiques (SXR) (Takeshita et al., 2006). La progression du cancer du sein humain peut se faire par l'activation de la voie de signalisation PI3K / AKT (Chen and Chien, 2014); ou par la voie de signalisation AhR / HDAC6 / c-myc indépendante des œstrogènes, médiée par la cascade de signalisation cAMP-PKA-CREB1 (MDA-MB-231) . On pense que PPAR est le médiateur du carcinome hépatique induit par les phtalates chez les rongeurs. Néanmoins, des études faites sur des souris ont démontré que le carcinome hépatique est provoqué par le protooncogène c-jun via le système c-jun / c-fos / AP1; et que le PPAR peut agir par la modulation épigénétique du promoteur c-mycgène dans le carcinome hépatique.(Benjamin et al., 2017)

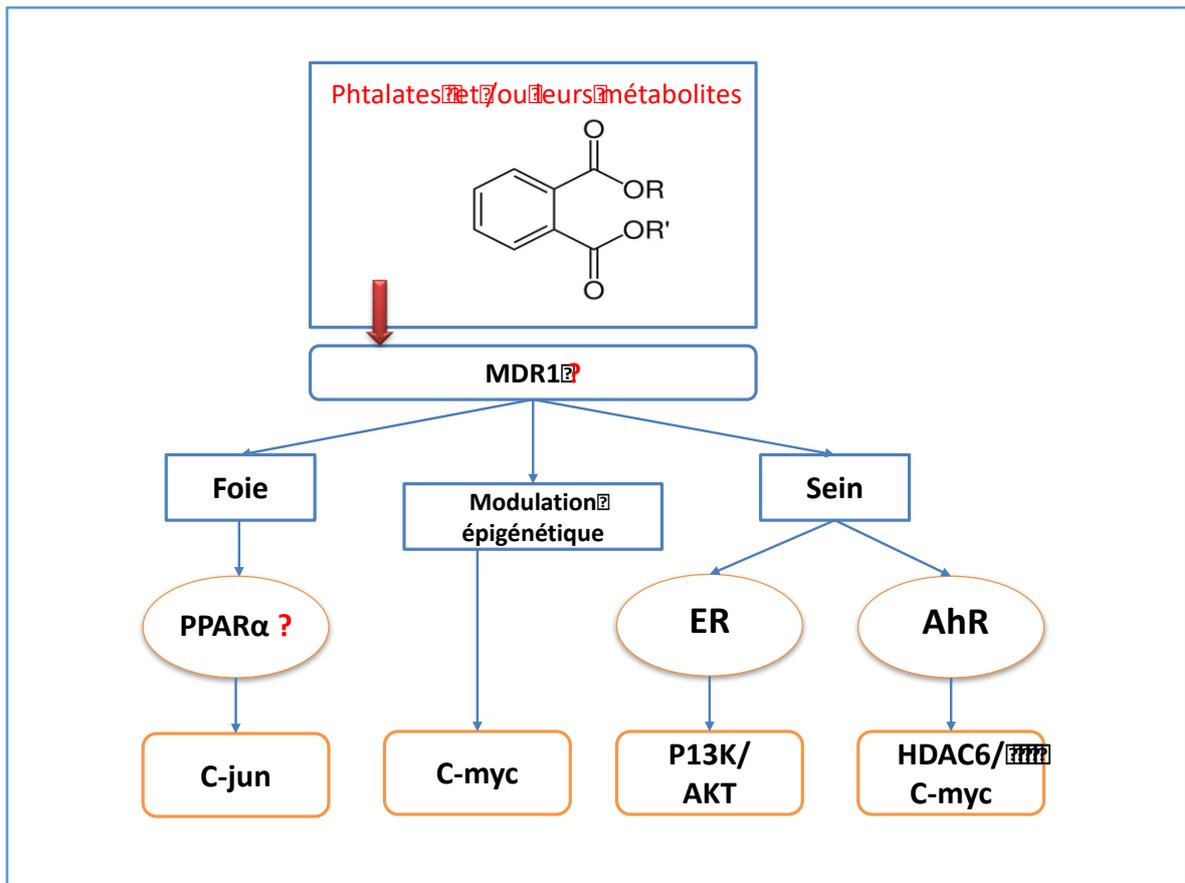


Figure 11 : Mécanisme de signalisation moléculaire plausible provoqué par les phtalates expliquent le développement de cancer. Abréviations: MDR (portail de résistance multidrogue), AhR (arylhydrocarbonreceptor), PPAR (peroxisome proliferator-enabled receptor) et ER (oestrogenreceptor)

IV.2 Effets sanitaires des phtalates :

La toxicité des phtalates sur l'organisme est un fait suspecté et examiné depuis de nombreuses années. En se basant à la fois sur les modèles animaux expérimentaux ainsi que sur les études épidémiologiques chez l'homme, un grand nombre d'équipes ont démontré les effets délétères de ces composés dans différents organes, notamment le foie, la thyroïde, ainsi que l'appareil reproducteur. (Muczynski, 2011)

IV.2.1 Effets sur le foie :

Le foie est le premier organe cible identifié de l'effet délétère des phtalates. Chez les rongeurs adultes, l'effet le plus évident d'une contamination chronique au DEHP par voie orale se traduit par une hépatomégalie prononcée, conséquence d'une hyperplasie et d'une hypertrophie des hépatocytes. (Fan et al., 2019)

Néanmoins ; les études de corrélation réalisées sur la toxicité des phtalates dans le foie chez l'homme n'ont pas démontré de liens entre les taux d'exposition et une quelconque altération hépatique. Les quelques groupes qui ont étudié l'action du MEHP sur des cultures

d'hépatocytes humains concluent à une absence d'effet sur la prolifération ou l'apoptose de ces cellules, ainsi que sur l'induction d'enzymes du peroxysoxe. (Muczynski, 2011)

IV.2.2 Effets sur la thyroïde et le système immunitaire :

Outre le foie, cible privilégiée des phtalates, ces derniers sont également connus pour leur incidence néfaste sur d'autres fonctions biologiques de l'organisme. Il n'existe toutefois qu'une faible documentation relative à ces effets. (Muczynski, 2011, Wang et al., 2018)

Au niveau de la thyroïde, deux études montrent que l'exposition de rats adultes au DBP ou DEHP induit une diminution de la production d'hormones thyroïdiennes T3 et T4. Chez l'homme, seules quelques études épidémiologiques mettent en évidence une corrélation entre des taux de phtalates élevés et un dysfonctionnement de la fonction thyroïdienne. Huang et collaborateurs montrent une corrélation entre les taux de MBP chez la femme enceinte et une diminution de l'hormone T4 libre et totale. (Meeker et al., 2009)

D'autre part, une étude a mis en évidence la relation dose-réponse entre les métabolites urinaires du phtalate et l'hormone thyroïdienne. Les valeurs urinaires maximales de huit métabolites de phtalate chez les travailleurs exposés étaient supérieures à celles des témoins, les travailleurs avaient des niveaux plus élevés de monobenzyl urinaire phtalate, phtalate mono (2-éthyl-5-hydroxyhexyle) sérum total de T3 et le rapport T3 /T4. (Wang et al., 2018) De même, Meeker et collaborateurs mettent en évidence une corrélation entre les taux de MEHP chez l'homme adulte et la diminution de la fraction libre des hormones thyroïdiennes T3 et T4. Une autre étude a mesuré les taux de différents phtalates chez les enfants Danois de 4 à 9 ans et montre chez les filles une corrélation inverse entre ces taux de phtalates et les taux d'hormone T3 pour les fractions libres et totales. Chez les garçons, une tendance est observable mais n'est pas significative.

La présence de métabolites du DEHP serait plus particulièrement associée à des désordres thyroïdiens (Muczynski, 2011)

Une étude faite en Chine a mis en évidence l'association entre la présence de MEP et le cancer thyroïdien ainsi que des nodules bénignes (Liu et al., 2020)

Le DBP a un effet immunotoxique ; l'exposition à ce dernier affecte la fonction des macrophages (Xu et al., 2015, Ashley-Martin et al., 2015)

IV.2.3 Effets sur la reproduction :

Les phtalates sont surtout étudiés pour leur toxicité sur la fonction de reproduction mâle et femelle et le développement de cette fonction au cours de la grossesse.

Il n'existe à l'heure actuelle que peu d'études décrivant la toxicité des phtalates sur la fonction de reproduction. Dans leur grande majorité, ces études sont d'ailleurs des études épidémiologiques qui mettent en évidence des corrélations entre la mesure du taux de phtalates dans l'organisme et l'apparition de certaines anomalies de la fonction de reproduction. Il existe toutefois quelques rares études expérimentales qui restent très difficiles à mettre en place. (Muczynski, 2011)

IV.2.3.1 Fonction de reproduction chez la femme :

Des études de corrélation ont établi un lien entre le taux des phtalates dans les urines de femmes enceintes et l'augmentation de cas de complication pendant la grossesse, tel que l'anémie ou la prééclampsie, ainsi qu'une réduction de la durée de la grossesse. D'autres études de corrélation ont mis en relation les taux de phtalates retrouvés dans les urines de jeunes filles avec l'apparition d'une puberté précoce. (Muczynski, 2011)

D'autres études ont prouvé une relation entre les phtalates et la survenue du diabète type 2 et la résistance à l'insuline chez l'être humain. (Shapiro et al., 2015)

In vitro, une étude expérimentale de culture de cellules de granulosa humaines montre que l'addition de MEHP (10^{-4} à $5 \cdot 10^{-4}$) au milieu de culture provoque une inhibition de la production d'oestradiol et de progestérone, ainsi que de l'activité aromatasase de ces cellules. (Muczynski, 2011)

IV.2.3.2 Fonction de reproduction chez l'homme :

Chez l'homme, deux études épidémiologiques pionnières de Shanna H, Swan et Katharina M. Main sont véritablement à l'origine des liens supposés entre l'exposition in utero aux phtalates et l'apparition d'anomalies de la fonction de reproduction masculine. (Swan et al., 2005)

Ces deux études mettent en évidence un défaut de masculinisation du fœtus au cours de la vie fœtale qui pourrait expliquer l'apparition des anomalies de la fonction de reproduction masculine observables à la naissance ainsi qu'à l'âge adulte.

La première étude réalisée aux États-Unis chez les enfants de 2 à 36 mois, a montré une corrélation entre les taux de différents phtalates mesurés dans les urines de mère avant la naissance et la réduction de l'index Ano-Génitale, critère de la masculinisation du fœtus. La deuxième étude faite sur une cohorte de garçons Danois et Finlandais âgés de 3 mois, a mis en évidence une corrélation entre les taux de plusieurs phtalate mesurés dans le lait maternel à la naissance et la modification de plusieurs indicateurs de la masculinisation du nouveau-né. Cette étude montre une corrélation positive avec le niveau de Sex Hormone Binding Globulin et une corrélation négative avec le rapport LH/ testostérone libre ainsi que le taux de testostérone total. (Muczynski, 2011)

D'autre part, l'étude expérimentale mettant en évidence l'effet des phtalates sur le testicule fœtal humain. Hallmark et collaborateurs se sont penchés sur l'impact du DBP sur la fonction stéroïdogène du testicule fœtal humain au deuxième trimestre de la grossesse sans toutefois mettre en évidence une modification de la production de testostérone induite par ce composé. (Muczynski, 2011) D'autre étude expérimentale a prouvé que l'exposition à long terme aux phtalates à bas poids moléculaire provoque un dysfonctionnement des cellules sertoli. (Kumar et al., 2015)

IV.2.4 Effets cancérigènes :

L'exposition au DEHP et au DBP a été associée à une augmentation de l'incidence de carcinome hépatocellulaire chez les rongeurs. Il agirait vraisemblablement via le récepteur du facteur d'activation des peroxyases. Néanmoins, ce phénomène ne se retrouve pas chez l'homme. (Ventrice et al., 2013, Bergé, 2012)

La cancérogénicité des phtalates chez l'homme a été signalée pour la première fois dans les années quatre-vingt-dix. Une étude cas-témoins (Selenskas et al., 1995), menée auprès de travailleurs d'une industrie du plastique aux États-Unis, a montré un risque nettement accru

de cancer du pancréas. Une récente enquête épidémiologique au Mexique a signalé une corrélation positive entre les concentrations urinaires de diéthyl-hexyl-phtalate et le risque de développer un cancer du sein. (Ventrice et al., 2013)

IV.2.5 Effets mutagènes et tératogènes :

L'administration de DEHP et DBP chez l'homme provoque des effets sur les lymphocytes et les cellules des muqueuses, des patients sous dialyse recevant approximativement 150mg de DEHP par semaine ont été examinés. Au bout d'un mois, aucun changement morphologique n'a été observé, cependant, après un an d'exposition, les peroxisomes ont été rapportés pour être significativement plus importants en nombre. (Bergé, 2012)

IV.2.6 Effets perturbateurs endocriniens

Les phtalates sont reconnus pour être des perturbateurs endocriniens et peuvent à ce titre entraîner des troubles de la reproduction, du développement et de l'immunité. Plusieurs phtalates et leurs métabolites sont suspectés d'avoir des effets perturbateurs endocriniens.

Le mécanisme d'action sous-jacent à la toxicité du DEHP n'est pas encore compris, il est probable que la capacité à agir comme un perturbateur endocrinien chimique peut au moins, en partie, contribuer aux changements neurologiques et comportementaux observés chez les animaux et les humains. Les effets de l'exposition au DEHP sur la signalisation des œstrogènes et des androgènes sont plus au moins documentés. (Bergé, 2012, Holahan and Smith, 2015)

IV.2.6.1 Effets œstrogènes :

Il existe des preuves suggérant que le DEHP peut altérer les voies de signalisation des œstrogènes. L'exposition in vitro au DEHP produit une faible activité œstrogénique via le récepteur humain d'œstrogène ER α . Après de faibles doses d'exposition au DEHP, une régulation négative importante du récepteur de la progestérone (une cible d'œstrogène) et une régulation négative du CYP17a1 (un gène important dans la synthèse des hormones stéroïdes) ont été observées chez les hommes et les femmes. Une diminution des taux sériques d'estradiol et de progestérone a été signalée chez des rats femelles et chez des rats mâles en culture cellules de la granulosa après exposition au DEHP et au MEHP. (Holahan and Smith, 2015, Gao et al., 2015)

Pocar et al. (2012) ont émis l'hypothèse que de faibles niveaux d'œstrogène peuvent avoir un effet négatif sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. À cet égard, la sécrétion de gonadotrophines telles que l'hormone lutéinisante (LH; important pour la synthèse de

testostérone) et le stimulant follicule hormone (FSH; important pour la stéroïdogénèse) peuvent être altérés. (Holahan and Smith, 2015)

IV.2.6.2 Effets anti-œstrogène :

L'effet anti-œstrogène des phtalates se traduit par le blocage des hormones sexuelles par ces contaminants. Une activité anti-œstrogène du DEHP a été décrite par diminution de l'activité aromatasase dans les cellules de la granulosa qui intervient dans la synthèse du 17B-oestradiol, entraînant une rupture du cycle ovarien chez le rat.(Bergé, 2012)

IV.2.6.3 Effets anti-androgènes :

L'effet anti-androgène des phtalates se traduit par la diminution de la libido et de la spermatogenèse des espèces par l'action de ces molécules à la place des hormones sexuelles. Une diminution de la concentration spermatique a également été enregistrée chez les mammifères, notamment le rat ainsi que chez l'homme, pour une dose de 1g/kg/jour. (Bergé, 2012, Huffman et al., 2018)

Les androgènes, tels que la testostérone, sont essentiels à la masculinisation du cerveau. Les propriétés anti-androgènes du DEHP peuvent être liées à la perturbation de la fonction des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig pendant les périodes de développement sensibles. (Holahan and Smith, 2015)

Les cellules de Leydig sont essentielles à la synthèse de la testostérone alors que les cellules de Sertoli jouent un rôle essentiel dans la masculinisation cérébrale et la déféminisation en convertissant la testostérone en œstradiol via l'enzyme aromatasase.

Une réduction du nombre ou du fonctionnement de Leydig et les cellules de Sertoli peut entraîner une altération des niveaux de la testostérone et de l'estradiol, ce qui peut avoir des conséquences critiques pour la masculinisation du cerveau.

Un certain nombre d'études ont signalé une diminution de la testostérone sérique chez les animaux après une exposition au DEHP. (Holahan and Smith, 2015, Xie et al., 2015b, Marie et al., 2015)

Dans une étude (Parks et al., 2000), une réduction de 60 à 85% de la production de testostérone a été signalée après l'exposition au DEHP, de sorte que les niveaux de testostérone chez les hommes ont été réduits à des niveaux observés chez les femmes.

Akingbemi et al. (2001) ont montré que l'exposition maternelle au DEHP réduisait le taux de testostérone lorsque la progéniture mâle avait 21 et 35 jours, mais après 90 jours, la production de testostérone était équivalente à celle des témoins mâles. (Holahan and Smith, 2015)

La production de testostérone dans les cellules de Leydig est réglementée par LH. L'exposition maternelle ou postnatale (14 jours) au DEHP réduit les niveaux de LH chez les hommes, tandis qu'une exposition postnatale plus longue (28 jours) ont entraîné une augmentation des taux de LH chez les hommes. (Holahan and Smith, 2015)

Chez l'être humain, trois études fournissent des preuves de l'implication des phtalates dans la modification de la production fœtale d'hormones sexuelles (y compris la testostérone, estradiol et progestérone) et le facteur 3 semblable à l'insuline pendant la grossesse

Deux études de cohorte ont montré que l'exposition in utero au DEHP était associée à une diminution des taux d'hormones sexuelles (testostérone libre et / ou le rapport testostérone / estradiol libre) dans le sang de cordon des nouveau-nés chez les filles (MEHP, MEHHP et MEOHP: Lin et al., 2011) et chez les garçons (MEHP: Araki et al., 2014). (Marie et al., 2015)

Araki et al. témoignent également une diminution de l'inhibine B, un marqueur de la fonction de Sertoli, et de la progestérone. (Araki et al., 2014)

En revanche, Jensen et al. (2015) ont constaté que les niveaux de MECPP dans le liquide amniotique a été associé à une augmentation des niveaux l'hormone stéroïde dans le liquide amniotique (testostérone, androstènedione, progestérone, 17-OHprogestérone et cortisol). Cependant, ces études ont certaines limites.(Jensen et al., 2015) Dans l'étude d'Araki et al. (2014), l'exposition n'a pas été évaluée à des moments cohérents. Le sang a été prélevé entre 23 et 35 semaines de grossesse ou en une semaine après l'accouchement et seul le MEHP a été recherché et mesuré. Dans l'étude de Jensen et al. (2015), l'échantillonnage du liquide amniotique au deuxième trimestre a fourni une évaluation d'exposition proche de la fenêtre temporelle jugée importante pour le fœtus masculinisation. Cependant la collecte de ces échantillons s'étalait au cours de la période 1980–1996, ce qui entraîne un risque de biais dû à l'évaporation de l'échantillon. Néanmoins et Malgré certaines limites, ces études sont cohérentes dans leurs conclusions avec celles de nombreuses études faites sur les animaux. (Marie et al., 2015)

IV.2.7 ASTHME

Ces dernières années, les plastifiants, en particulier les phtalates, ont été liés à la pathogenèse de l'asthme. Bien que la principale source d'exposition aux phtalates est par voie orale, d'autres voies, y compris cutanée, parentérale et, en particulier, par inhalation, peuvent jouer un rôle important. De nombreuses études épidémiologiques et toxicologiques ont montré que la libération de phtalates du PVC peut augmenter le risque d'asthme et d'allergies (Ventrice et al., 2013, Whyatt et al., 2014, Sheikh and Beg, 2017)

Une étude cohorte menée afin d'évaluer l'association entre l'exposition des femmes enceintes aux phtalates et le développement de l'asthme chez leurs enfants a révélé une association significative entre les concentrations de MBzP, et le MnBP, dans l'urine maternelle prélevée au cours du troisième trimestre de la grossesse et le diagnostic d'asthme actuel chez les enfants âgés de 5 à 11 ans. (Pan et al., 2015)

Le risque d'asthme était noté chez les enfants dont les mères avaient des concentrations élevées de métabolites BBzP et DnBP pendant la grossesse dans le 3^{ème} trimestre par rapport au premier.

Ces résultats suggèrent que l'exposition prénatale au BBzP et au DnBP peut augmenter le risque d'asthme infantile. Les résultats soulèvent de nouvelles préoccupations selon lesquelles la présence d'expositions environnementales relativement omniprésentes pourrait avoir des effets respiratoires délétères. (Pan et al., 2015)

Les réponses immunitaires montrent que le processus de sensibilisation allergique implique la présentation d'antigènes aux cellules dendritiques, cellules Th2, mastocytes, éosinophiles et la production d'IgE, toutes les caractéristiques distinctives d'un asthme allergique. (Ventrice et al., 2013)

Quelques études menées sur l'inhalation d'aérosols ont montré que le DEHP est capable d'augmenter le taux sérique d'IgG1, mais pas d'IgE, et les niveaux de cellules inflammatoires, y compris éosinophiles, lymphocytes et neutrophiles dans les poumons et le liquide de lavage broncho-alvéolaire, mais l'effet n'est observé qu'à concentrations très élevées. D'autre côté l'exposition répétée au MEHP par air a le même effet que pour le DEHP, mais à des doses plus faibles. (Ventrice et al., 2013)

Malgré ces études, le mécanisme d'implication des phtalates dans l'asthme est encore loin d'être bien compris.

IV.2.8 AUTISME

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont un groupe de troubles neurologiques complexes, constamment croissant et réfractaire aux traitements médicamenteux. Une augmentation de la fréquence des TSA a été signalée au cours des 20 dernières années (Weintraub, 2011). L'étiologie est inconnue, mais on pense qu'elle résulte d'une perturbation des mécanismes neurobiologiques normaux principalement pendant la période prénatale. (Ventrice et al., 2013)

Afin d'évaluer la relation entre les phtalates et TSA, une étude a été menée pour évaluer les concentrations des métabolites primaires et secondaires du DEHP chez 48 enfants avec TSA (garçon : 36 ans, fille : 12 ans, âge moyen: 11 ans).

Une méthode de diagnostic, basée sur la détermination des concentrations de métabolites du DEHP (MEHP, 6-OH-MEHP, 5-OH-MEHP, 5-oxo-MEHP) par HPLC – ESI-MS a été appliquée à des échantillons d'urine. Une significative augmentation du 5-OH-MEHP et du 5-oxo-MEHP chez les patients atteints de TSA a été détectée par rapport au groupe témoin.

Ces résultats démontrent pour la première fois une relation entre l'exposition aux phtalates et les TSA, suggérant un rôle clé pour ces contaminants environnementaux dans la pathogenèse de l'autisme probablement en raison d'une action neurotoxique potentielle de ces substances. Des recherches récentes ont montré que l'exposition au DEHP commence au cours de la vie fœtale ; en fait, ce dernier est présent dans le lait maternel. Chez les enfants, après ingestion orale, le DEHP est rapidement absorbé et métabolisé dans le système gastro-intestinal en MEHP, qui est éliminé dans les urines après conjugaison avec l'acide glucuronique. Néanmoins, la capacité du glucuronide pour assurer cette conjugaison est réduite chez l'enfant pour cela les enfants représentent un groupe à risque plus élevé aux effets indésirables par rapport à la population générale. (Ventrice et al., 2013)

IV.2.9 OBESITE

Selon une étude faite en Belgique, aucune différence claire n'a été mise en évidence pour les niveaux urinaires des phtalates entre les groupes obèses et témoins. Aucune association n'a pu être établie entre des indicateurs d'obésité, tels que le poids, l'IMC ou le tour de taille et les teneurs en phtalates. (Dirtu et al., 2013)

Cependant, l'absence de corrélation n'exclut pas la possibilité de l'accumulation des phtalates dans les tissus adipeux et leur libération pendant la perte de poids doit être prise en compte dans les études futures. (Dirtu et al., 2013, Kim and Park, 2014)

Une autre étude était faite afin de déterminer si l'exposition prénatale au DEHP peut induire un syndrome métabolique chez les descendants.

Les résultats ont montré que l'exposition prénatale au DEHP à faible dose (0,2 mg / kg / jour) a entraîné un syndrome métabolique, y compris adipogenèse anormale, dépense énergétique et métabolisme du glucose chez la progéniture mâle. Notamment, le métabolisme hépatique de la thiamine a été perturbé chez ces descendants en raison de la dérégulation des enzymes de transport de la thiamine, qui a provoqué un métabolisme anormal du glucose. T4 Des taux urinaires des phtalates sont corrélés à une insulino-résistance chez l'adulte et à une surcharge pondérale, suggérant des effets obésogènes (Muczynski, 2011, Fan et al., 2019)

Dans le même sens une autre étude a révélé une association entre l'exposition aux phtalates et le bas poids corporel de nouveau né à la naissance. (Xie et al., 2015a)

IV.2.10 Troubles du comportement

Les données, peu nombreuses et récentes, concernent surtout les jeunes enfants. Une exposition prénatale aux phtalates affecterait le comportement social chez des petites filles

de moins de 2 ans et entraînerait des désordres psychiques associés à une hyperactivité chez des enfants de 4-9 ans. (Muczynski, 2011, Ejaredar et al., 2015, chantal, 2011)

Une étude faite sur des enfants agé de 2,5 et 11 ans a mis en évidence l'association entre l'exposition aux phtalates ; surtout MEHHP et le trouble de l'attention avec ou sans hyperactivité.(Ku et al., 2019)

IV.2.11 DIABETE

L'étude de NHANES 2001-2008 a prouvé l'impact potentiel des phtalates sur l'homéostasie du glucose et la résistance à l'insuline. Des fortes associations positives étaient rapportées avec la présence de MnBP, MiBP, MCPPE et Σ DEHP et à une glycémie à jeun élevée, à l'insuline à jeun et à la résistance à l'insuline, avec quelques variations selon la race / l'origine ethnique et moins par sexe. (Huang et al., 2014, Fan et al., 2019)

V. Méthodes d'analyse toxicologique des phtalates

La quantification des biomarqueurs d'exposition aux phtalates suit le déroulement général de l'analyse des contaminants organiques, à savoir prétraitement des échantillons, extraction et purification, concentration et reconstitution dans un solvant approprié et quantification par chromatographie couplé avec des détecteurs sensibles.(Kumar and Sivaperumal, 2016, Qureshi et al., 2016)

V.1 Prétraitement des échantillons :

Les métabolites urinaires du phtalate comprennent à la fois les formes libres et conjuguées. L'identification et la mesure des formes conjuguées peuvent être difficiles. Des méthodes analytiques sensibles et précises sont nécessaires pour mesurer les concentrations de ces espèces à l'état de traces. Une approche pour faciliter le dosage de ces composés a été développée. Il s'agit de mesurer la concentration totale de métabolites de phtalates (formes libres et conjuguées) après une hydrolyse enzymatique utilisant β -glucuronidase (d'*Escherichia coli*). Cette approche a été largement acceptée jusqu'à ce jour, car la β -glucuronidase obtenue à partir E. coli ne montre pas d'activité de lipase, sauf sa spécificité au glucuronyle conjugué. La β -glucuronidase à base d'*Hélice protima* n'est pas recommandée en raison de son activité lipase et arylsulfatase qui peut conduire à l'hydrolyse de diesters extérieurement contaminés. (Dewalque et al., 2014c)

L'hydrolyse acide n'est pas spécifique aux formes conjuguées ; par conséquent, cela pourrait conduire au clivage de la liaison ester. L'hydrolyse est réalisée par incubation d'un

échantillon d'urine (pH 6,7) avec de la β -glucuronidase à 37 ° C pendant 90 min. (Völkel et al., 2014)

L'ajout d'acide est recommandé pour arrêter l'activité enzymatique et éviter l'hydrolyse des phtalates, provenant d'une contamination extérieure, par des lipases (le cas échéant) présentes dans β -glucuronidase. (Kumar and Sivaperumal, 2016)

La dilution des échantillons d'urine est généralement pratiquée pour réduire la variation de matrice d'un échantillon à un autre pouvant affecter la récupération de l'analyte. (Solymos et al., 2011)

L'analyse directe sans extraction et nettoyage, appelée Méthode « diluer et tirer », a été rapportée comme un outil de dépistage rapide dans les tests de dopage. Cependant, le nettoyage et les étapes de concentration des échantillons sont nécessaires pour l'élimination de la matrice endogène. (Völkel et al., 2014)

L'extraction liquide-liquide (LLE) et extraction en phase solide hors ligne et en ligne (SPE) sont généralement les méthodes les plus utilisées. (Kumar and Sivaperumal, 2016)

V.1.1 Les méthodes d'extraction :

V.1.1.1 Extraction liquide-liquide :

a. Matrice eau :

L'extraction liquide-liquide est une application commune pour extraire les composés du type phtalates de la matrice eau.

L'extraction liquide-liquide est réalisée en extrayant, au moyen d'un solvant, les composés étudiés par une double ou triple extraction (volumes allant de 50 à 100 ml) et en regroupant les extraits en une seule phase. Globalement, les volumes d'échantillons nécessaires à l'extraction sont importants (de 500 à 1 000 ml), quelle que soit la famille analysée. D'autre part, seulement une étude par famille recourt à l'acidification de l'échantillon afin de le stabiliser. L'extraction est réalisée dans une bouteille en verre ambré, agitée pendant 15 à 20 minutes sur un système de « va-et-vient » avant décantation dans une ampoule à décanter. Certaines études ont montré que le meilleur solvant d'extraction était le dichlorométhane (DCM) avec des rendements allant de 87 à 98 %. En effet, le DCM est faiblement miscible dans l'eau, il extrait dans une large gamme de polarité, il possède une faible température d'ébullition, ce qui a pour effet d'augmenter la rapidité de son évaporation et, enfin, il est plus dense que l'eau et se retrouve donc dans la phase inférieure lors de l'extraction en ampoules à décanter (Schenck and Lehotay, 2000)

L'utilisation de sulfate de sodium anhydre dans la phase organique, après l'étape d'extraction, permet l'élimination des gouttes d'eau restantes. (Yue et al., 2014)

Les méthodes LLE sont toujours utilisées en raison de leur simplicité et rentabilité. Cette technique est généralement adoptée en cas d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC – MS). (Kumar and Sivaperumal, 2016)

Les échantillons d'urine sont acidifiés avec HCl à pH <2 avant LLE pour obtenir une protonation complète du groupe –COOH, ce qui à son tour facilite son extraction dans des solvants non polaires. Les solvants utilisés dans l'extraction avant la dérivation sont l'éther méthyl-tert-butyle, l'éther hexane et hexane dichlorométhane, alors que pour la post-dérivation, l'hexane et l'iso octane sont les solvants de choix. (Kranvogel et al., 2014)

La dérivation est suivie d'une évaporation de l'extrait et re-dissolution dans un solvant non polaire. (Gries et al., 2012)

Malgré les avantages de cette technique et utilisation courante, certains inconvénients tel que la consommation du temps et de l'intensité des solvants et du travail, rendent cette approche moins attrayante pour les études de biosurveillance à grande échelle. (Kumar and Sivaperumal, 2016)

V.1.1.2 Extraction en phase solide :

SPE est l'une des approches de préparation d'échantillons les plus importantes l'extraction des métabolites des phtalates de l'urine, avec modes hors ligne et en ligne.

a. SPE offline

Les méthodes SPE hors ligne utilisent généralement une phase hydrophobe en phase inversée -sorbants polymères hydrophiles équilibrés (HLB). Les métabolites des phtalates présentent une large gamme de polarité, les sorbants HLB sont préférés par la plupart des travailleurs. Il s'agit notamment de SPE à phases polyamide, le poly [n-vinylpyrrolidone-divinylbenzène (DVB)], le DVB de méthacrylate et le DVB de polystyrène hydroxylé (par ex. OASIS HLB, STRATA XL, Super select HLB, Bond Elut Plexa et ISOLUTE ENV +). Les avantages des sorbants HLB sont la stabilité à une gamme de pH large, aucune interaction avec le silanol et aucun effet du séchage par sorbant. (Herrero et al., 2015)

Une granulométrie de 30 à 60 µm est préférée, car elle permet un passage rapide des protéines et autres biomolécules d'urine. Pour une urine typique de volume de 1,0 ml, la masse sorbante de 150-200 mg et une cartouche de capacité de 5 à 6 ml sont préférées.

Un autre choix de sorbant est le mode mixte SPE, à la fois polymère (par exemple OASIS MAX) et silice liée (par exemple Bond Elut certifiée, SimpliQ) avec plusieurs points de rétention. Elles sont utiles dans l'extraction des métabolites de phtalate. (Rastkari and Ahmadkhaniha, 2013)

Les cartouches SPE doivent être choisies avec soin, car certaines marques contribueraient à des niveaux élevés de blanc. Ce problème pourrait être évité avec les cartouches SPE en verre. (Kuklenyik et al., 2009)

Des variantes de SPE, telles que la microextraction en phase solide (SPME), ont été proposées. Une technique SPME sans solvant en utilisant la dérivation du diazométhane sur fibre en phase gazeuse a été proposée par Alzaga et al. Une autre nouvelle procédure d'extraction utilisant l'extraction magnétique en phase solide (MSPE) avec revêtement magnéto nanotubes de carbone à parois multiples (MWCNT) a été proposée par Rastkari et al. Cette procédure offre une excellente préconcentration des métabolites des phtalates et la limite de détection (LOD) est de l'ordre 0,025 à 0,050 µg/L. (Rastkari and Ahmadkhaniha, 2013, Liu and Zone, 2008)

SPE offre une meilleure sélectivité et une récupération plus élevée, et utilise beaucoup moins de solvant que le LLE. et d'autre part les collecteurs SPE automatisés améliorent considérablement les étapes SPE; cependant, l'évaporation et la reconstitution des extraits d'urine consomment encore du temps et des solvants. De plus, ces méthodes produisent des quantités de déchets importantes (cartouches SPE jetables). (Kumar and Sivaperumal, 2016)

b. SPE online :

La SPE en ligne couplée à la HPLC permet une automatisation, une sensibilité et une bioanalyse sélective. Le couplage se fait en connectant un petit pré-colonne, généralement de 2 à 15 mm de long et de 1 à 4,6 mm de diamètre intérieur, utilisée comme Colonne SPE, vers une HPLC conventionnelle via une vanne de commutation. Le choix du sorbant est un point clé de la SPE en ligne, car il peut contrôler les paramètres telles que la sélectivité, l'affinité et la capacité. En règle générale, le sorbant utilisé dans la colonne SPE doit être similaire au matériau emballé dans la colonne analytique. La colonne SPE doit avoir une absorbance plus faible pour les analytes. Cela garantit que lors de l'élution de la SPE colonne à la colonne analytique, la bande d'analyte se recentrera sur l'avant de la colonne analytique. (Sabaredzovic et al., 2015)

Les colonnes SPE-HPLC typiques utilisées pour l'analyse des métabolites de phtalates

sont la silice liée à C18 (Hysphre-C18HD: Intertsil ODS-3) et monolithique de silice à liant (Chromolith Flash RP-18e: BETASIL Phényle) . Les colonnes SPE monolithiques offrent une meilleure masse de transfert et d'enrichissement d'analyte que les colonnes remplies.(Tsochatzis et al., 2017)

Un autre développement de SPE en ligne est l'utilisation d'un accès restreint (RAM), qui retient sélectivement les analytes, tandis que la matrice est rincée dans les déchets sur la base du mécanisme d'exclusion de taille. **(Koch et al., 2003)**

Koch et al. ont été les premiers à utiliser la précolonne RAM (LiChrospher RP – ADS) couplé à LC – MS / MS pour le nettoyage en ligne et la détermination des monoesters et des métabolites secondaires des phtalates . La RAM est couplée à la HPLC via une vanne de commutation pour offrir un enrichissement en ligne entièrement automatisé des analytes et des échantillons nettoyés. Il se compose d'un hydrophile et d'un externe électroneutre surface des particules (silice alkyl-diol) et une phase inversée hydrophobe de surface interne (C4, C8 ou C18), et est spécialement conçu pour l'injection directe et répétitive d'échantillons. Les propriétés bimodales permettent la rétention d'analytes de faible poids moléculaire aux surfaces des pores lipophiles, tandis que les constituants macromoléculaires sont exclus (> 15 kDa).(Preuss et al., 2005, Koch et al., 2003) Après l'étape d'enrichissement et de nettoyage, la fraction d'analyte est transférée par le mode de rinçage de précolonne sur la colonne analytique. Tous les processus de transfert, d'élution et de conditionnement des deux colonnes est effectué avec dispositifs de pompage en continu, résultant en un système entièrement automatisé et un débit d'échantillonnage élevé. Par conséquent, il convient bien à un programme de grande échelle de biosurveillance (Kuklenyik et al., 2009). La SPE en ligne ne nécessite que 0,1 ml d'urine, en plus d'une moindre consommation de solvants. Comme l'extrait d'urine entier est transféré en HPLC, en ligne les méthodes donnent une meilleure sensibilité que la SPE hors ligne.(Kumar and Sivaperumal, 2016)

c. SPE HORS LIGNE VERSUS SPE EN LIGNE

Les deux méthodes SPE hors ligne et en ligne ont leurs propres avantages et leurs inconvénients. Elles donnent des limites de détections comparables, une précision et une reproductibilité comparables pour l'analyse des métabolites des phtalates, néanmoins les méthodes hors ligne utilisent un volume important d'échantillon (1,0 à 2,0 ml) afin de compenser la sensibilité marquée dans les méthodes en ligne. Pour SPE en ligne, la manipulation des échantillons est minimisée, par conséquent, l'exposition de l'opérateur

à des produits chimiques et à des erreurs de mesure dû à la manipulation manuelle est absente. De plus, l'utilisation de SPE en ligne n'implique pas l'évaporation et la reconstitution de l'extrait d'urine, par conséquent, les pertes d'analyte par évaporation sont éliminées. En ligne La SPE est également mieux adaptée aux études de biosurveillance à grande échelle, qui nécessitent un débit d'échantillonnage élevé.

Les inconvénients de SPE en ligne incluent la possibilité de contamination croisée et le surcharge de la colonne. Pour surmonter cela, des pompes binaires séparées pour SPE et HPLC et un nettoyage efficace sont nécessaires. (Kato et al., 2005, Kumar and Sivaperumal, 2016)

V.1.2 Purification de l'extrait

La purification est une étape importante qui permet l'élimination des impuretés présentes dans l'éluant récupéré lors de l'étape d'extraction. En effet, l'élution des analytes peut entraîner celle d'interférents ayant des propriétés similaires. Différentes techniques existent pour purifier un échantillon. Généralement, l'étape de purification s'effectue en passant l'éluant récupéré lors de la phase d'extraction sur une colonne de purification en silice. Les solvants utilisés pour éluer les composés après purification sont de la même nature que ceux utilisés lors de l'étape d'extraction : toluène, mélange hexane/diethylether, acétate d'éthyle. (Dewalque et al., 2014c, Net et al., 2015)

V.1.3 Concentration de l'extrait

Cette étape suit directement l'étape de purification de l'extrait et a pour objectif de concentrer les composés étudiés dans un plus petit volume de solvant (jusqu'à un volume final allant de 0,5 à 1ml). Il est important de noter que cette étape d'évaporation de l'extrait s'effectue à température douce, généralement comprise entre 35 et 50°C.

Deux techniques sont couramment utilisées pour concentrer les extraits. La première consiste à faire évaporer le solvant en utilisant un évaporateur rotatif ; cette technique est généralement utilisée pour de grands volumes à évaporer. La seconde, réservée aux plus petits volumes à concentrer, consiste à faire évaporer le solvant sous courant d'azote. (Kim et al., 2014)

V.2 Les méthodes d'analyses :

V.2.1 Analyse par GC-SM :

L'analyse directe des métabolites des phtalates par GC – MS n'est pas réalisable en raison de la polarité et de la faible volatilité des analytes. Blocage le groupe fonctionnel –COOH par dérivatisation est la stratégie en GC – MS. (Kim et al., 2014, Tsochatzis et al., 2017)

V.2.1.1 Dérivatisation de l'échantillon

La dérivatisation consiste en un ajout d'éléments halogénés sur les molécules permettant de rendre les composés dérivés plus volatils et ainsi favoriser leur analyse par chromatographie gazeuse. L'agent dérivant le plus couramment utilisé est le PFBCl (chlorure de pentafluorobenzyl). Cependant, d'autres réactifs de dérivation peuvent être employés. C'est le cas du MTBSTFA et le BSTFA. L'étape de dérivation, appelée aussi silylation, s'effectue en ajoutant un petit volume de l'agent dérivant (100 µl) dans l'échantillon, plongé dans un bain-marie à 60°C pendant 15 à 30 minutes (Kim et al., 2014)

Une autre technique de dérivation peut être employée. Il s'agit de la dérivation par méthylation, qui permet de fixer un groupement méthyle sur les alkylphénols. La principale différence entre les deux techniques de dérivation vient du réactif employé pour dériver. En effet, la méthylation utilise un réactif plus simple (utilisation de méthanol ou de TMSH) que la dérivation par silylation (réactifs à base de groupements silyles) (He et al., 2015)

V.2.1.2 Détection par spectromètre de masse (MSD) :

Cette détection s'effectue par ionisation électronique. La GC/MS permet l'étude et l'analyse des phtalates, Par conséquent, cette méthode est la plus couramment utilisée.

Lors de l'analyse par détection par spectromètre de masse, il peut y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques. En effet, cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire. Le Tableau regroupe les masses caractéristiques des principaux phtalates étudiés par GC/MS dans la littérature. (Gries et al., 2012, Kumar and Sivaperumal, 2016)

Tableau VII : Masses caractéristiques des principaux phtalates (Zaki, 2015)

| Composé | Masse caractéristique |
|---------|-----------------------|
|---------|-----------------------|

| | |
|-------------|-----------------------------|
| DMP | 133 – 149 – 163 |
| DEP | 149 – 177 – 222 |
| DnBP | 104 – 149 – 205 – 223 – 278 |
| BBP | 91 – 149 – 206 – 238 – 312 |
| DEHP | 149 – 167 – 279 – 390 |

V.2.1.3 Optimisation de la technique

Plusieurs caractéristiques importantes sont à prendre en compte lors de l'optimisation de la méthode d'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

A. Le type de colonne

Les phtalates sont des composés peu polaires. Le choix sera donc porté vers une colonne apolaire du type DB-5MS (J&W), ZB-5MS (Zebron) ou RTX-5MS (Restek) dont les caractéristiques sont synthétisées en Tableau (VIII). Cependant, d'autres colonnes sont utilisées dans la littérature où la principale caractéristique qui varie est la longueur de la colonne. (Kumar and Sivaperumal, 2016)

Tableau VIII : Principales colonnes utilisées en GCMS (Bergé, 2012)

| Nom de la colonne | Caractéristiques |
|-------------------|-------------------------|
| DB5MS | 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm |
| ZB5MS | 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm |
| TTX5MS | 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm |
| HP5MS | 15 m x 0,25 mm, 0,25 µm |
| HT8 | 50 x 0,22 mm, 0,25 µm |

B. Le mode d'injection de l'échantillon

C'est un autre paramètre important à choisir lors de l'optimisation de la méthode. Plusieurs modes d'injections sont à disposition tels que les modes split, splitless ou encore plused splitless (Yue et al., 2014)

➤ En mode split (injection avec division), l'échantillon est vaporisé, mélangé avec le gaz vecteur et divisé en deux parties dont seulement la plus petite est envoyée en tête de colonne. Ce mode d'injection est privilégié lors de l'analyse de composés fortement concentrés et nécessite une température d'injection élevée.

➤ En mode splitless (injection sans division) vaporise et mélange l'échantillon, avec le gaz vecteur, mais, contrairement au mode split, ne divise pas l'échantillon. De plus, l'échantillon reste quelques secondes dans le liner avant d'être transféré dans la colonne. Il

est important de noter que cette méthode permet la concentration de l'échantillon en tête de colonne et a pour objectif d'analyser les composés volatils (ou semi-volatils) à l'état de trace.

Dans le cas de l'analyse des phtalates, le mode splitless sera donc le mode privilégié. Ces dernières années, une méthode dérivée de l'injection sans division a été élaborée. Il s'agit du mode pulsed splitless, similaire au mode splitless à l'exception de l'ajout d'une pression accrue au niveau du liner en début d'analyse. L'avantage de cette modification est de maximiser l'introduction de l'échantillon dans la colonne et ainsi éviter les pertes. Cependant, le mode splitless est un mode d'injection très sensible, difficile à optimiser et qui peut être réalisé par deux techniques différentes. (Kim et al., 2014)

- La première technique est le piégeage à froid. Elle permet de réduire la migration des constituants possédant des températures d'ébullition élevées sur la colonne. Les produits se déposeront en tête de colonne pendant la période de transfert et seront ensuite analysés pendant la montée en température du four. Une différence de température d'environ 60°C entre la température de la colonne pendant l'injection et la température d'élution du premier pic intéressant doit être respectée. En cas contraire, un effet d'étalement de pic est constaté sur le chromatogramme.
- La deuxième technique est l'effet solvant. Cette technique a pour but de condenser le solvant en tête de colonne en fixant la température du four 20 à 30°C en dessous de la température d'ébullition du solvant. Ce solvant joue le rôle de phase stationnaire vis-à-vis des différents constituants de l'échantillon. Les températures d'ébullition des principaux solvants utilisés dans l'analyse des phtalates seront données en Tableau (IX). La présence de solvant condensé dans la colonne peut durer de quelques secondes à quelques minutes en fonction des divers facteurs (temps de purge, température d'ébullition du solvant, pression en tête de colonne...). (Cariou et al., 2016)

Le temps de splitless se situe généralement entre 30 et 90 secondes. Enfin, le temps d'activation de la purge doit être judicieusement choisi. Si ce temps est trop grand, les pics proches du pic du solvant seront masqués dans la traînée du solvant. En revanche, si ce temps est trop court, la sensibilité sera trop faible et la discrimination des pics sera accrue. (Gries et al., 2012)

Tableau IX : Températures d'ébullition des principaux solvants utilisés dans l'analyse des

| Solvant | Température d'ébullition (°C) |
|---------|-------------------------------|
|---------|-------------------------------|

| | |
|------------------|-------|
| Acétate d'éthyle | 77,0 |
| Toluène | 110,6 |
| Méthanol | 64,7 |
| Dichlorométhane | 39,75 |
| Chloroforme | 61.2 |

V.2.1.4 Avantage et inconvénient

Les avantages des méthodes basées sur GC – MS sont leur disponibilité dans la plupart des laboratoires, simplicité, robustesse, reproductibilité et absence d'effets de suppression des ions. Cependant, bien que la plupart des réactions de dérivation sont très spécifiques, cela ne fonctionne bien qu'avec des extraits sans eau. De plus, les procédures de dérivation sont laborieuses et la manipulation du diazométhane, un produit hautement toxique et composé explosif, nécessite des précautions particulières. De plus, les temps d'exécution plus longs rendent les méthodes GC – MS moins attrayantes à grande échelle d'études de biosurveillance. (Kumar and Sivaperumal, 2016)

V.2.2 Analyse par chromatographie en phase liquide :

LC couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle (MS / MS) est l'équipement standard pour la quantification de petites molécules comme les métabolites des phtalates, car il offre une bonne sensibilité, reproductibilité et une large gamme dynamique. (Jeong et al., 2011)
En plus l'étape de dérivation n'est pas nécessaire

V.2.2.1 Détection par spectromètre de masse (MSD).

ESI en mode négatif est la technique d'ionisation la plus utilisée pour les métabolites des phtalates. L'ESI est préféré à l'ionisation chimique (IC), car les métabolites ayant deux groupes –COOH ne s'ionisent pas sensiblement dans CI. (Silva et al., 2004). La plupart des chercheurs ont déterminé les métabolites phtalate de monométhyle (MMP), phtalate de monoéthyle (MEP), phtalate de mono-n-butyle (MBP), phtalate de mono-isobutyle (MiBP), phtalate de monobenzyle (MBzP), phtalate de mono- (2-éthylhexyle) (MEHP), mono- (2-éthyl-5-hydroxyhexyl) phtalate (MEHHP), et phtalate de mono- (2-éthyl-5-oxohexyle) (MEOHP). (Silva et al., 2008)

Les effets de matrice sont l'un des principaux problèmes affectant l'efficacité ESI, en particulier dans les méthodes analytiques multi classes, car optimale les conditions d'extraction et de nettoyage sont nécessaires pour une grande variété des analytes, y compris les métabolites des phtalates. (Kumar and Sivaperumal, 2016, Chang et al., 2013)

Récemment, la chromatographie en phase liquide à très haute performance – masse spectrométrie (UHPLC – MS / MS) a été rapportée pour la quantification des métabolites des phtalates avec une réduction substantielle de temps et consommation de solvant. (Servaes et al., 2013)

Il est important de noter que les masses caractéristiques utilisées en dosage SIM en GC/MS Correspondent aux transitions utilisées en HPLC. (Bergé, 2012)

V.2.3 Assurance qualité :

Des protocoles de collecte, de manipulation et de stockage stricts sont nécessaires pour préserver l'intégrité des échantillons et un personnel qualifié et expérimenté est nécessaire pour produire des données fiables. Les métabolites urinaires du phtalate sont chimiquement stables pendant plusieurs années si conservés à -70°C ; par conséquent, les cycles Gel-dégel fréquents doivent être évités en répartissant l'échantillon en plusieurs parties. (Bergé, 2012, Schantz et al., 2015)

V.2.3.1 Facteurs influençant l'interprétation des données sur les métabolites du phtalate urinaire

Les données sur les métabolites phtalates urinaires représentent une mesure intégrée d'exposition de toutes les sources et de toutes les voies et l'utilité des données dépendent fortement de la capacité d'interpréter et de tirer des conclusions. En général, l'évaluation de l'exposition aux phtalates est liée directement aux concentrations de biomarqueurs dans un échantillon d'urine et la variation des niveaux mesurés est la variation d'exposition externe. Ainsi, les approches de dosimétrie inverse ont été utilisées pour estimer les valeurs de l'apport journalier (DI) afin de les comparer par rapport à la dose de référence (RfD) pour l'évaluation des risques. Cependant, il existe plusieurs facteurs qui contribuent à la variation des concentrations mesurées. (Guo and Kannan, 2012, Völkel et al., 2014)

Ceux-ci peuvent être largement classés en

- 1- Variations liées au moment du prélèvement des échantillons par rapport aux événements d'exposition
- 2- Variations liées aux caractéristiques physiologiques de l'urine
- 3- Variations liées à la toxicocinétique des phtalates.

Les métabolites des phtalates sont principalement mesurées dans un échantillon d'urine avec une hypothèse implicite que la concentration mesurée dans un aliquote urinaire unique est un substitut raisonnable pour concentration urinaire de 24 h. Cette hypothèse n'est valable que si l'exposition est cohérente et le composé chimique a une longue demi-vie

d'élimination. Cependant, les phtalates ont des demi-vies très courtes (<12 h). (Christensen et al., 2012, Kumar and Sivaperumal, 2016)

La variation du débit urinaire due à l'apport hydrique peut entraîner des variations substantielles de la concentration de biomarqueurs, outre l'âge et les influences de genre.

La correction de la créatinine a été largement utilisée dans les études de biosurveillance comme méthode d'ajustement pour les variations d'hydratation. (Lorber et al., 2011)

Dans cette approche, le biomarqueur mesuré est divisé par la concentration de créatinine de l'échantillon mesuré, ce qui donne une mesure de la masse de l'analyte par masse de créatinine. Cette approche est basée sur le taux d'excrétion de créatinine assez constant. Cependant, les concentrations de la créatinine urinaire sont influencées par l'âge, le sexe, l'activité physique, indice de masse corporelle et race / origine ethnique. Par conséquent, les valeurs corrigées et non corrigées doivent être déclarées. (Kumar and Sivaperumal, 2016)

Les processus pharmacocinétiques comme par exemple l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination des phtalates dépendent à la fois de la nature du parent diester et les caractéristiques physiologiques de l'individu. Il a été démontré que la variabilité est spécifique au biomarqueur. Par exemple, certains métabolites des phtalates, à savoir MEP, MBP et MBzP, sont moins sensibles aux variations interindividuelles. (Frederiksen et al., 2014) Certaines sections de la population sous-groupes, tels que les nouveau-nés, les enfants et les femmes enceintes, ont un mode d'élimination des métabolites de phtalates remarquablement différent avec des adultes. Par exemple, les nouveau-nés éliminent plus de proportion de métabolites carboxy secondaires des phtalates à longue chaîne (DEHP, DiDP et DiNP) que leurs mères et le ratio de MEHP à la somme des métabolites DEHP augmente avec l'âge chez les enfants et adolescents. D'autre part les concentrations de métabolites de phtalates sont plus élevées pendant la grossesse que les autres périodes. (Kumar and Sivaperumal, 2016)

V.2.3.2 Le problème de blanc et système chromatographique

-Le problème majeur dans l'analyse phtalate est la contamination, résultant en faux positifs ou concentrations surestimées. Le risque de contamination est présent dans l'ensemble du système d'analyse, y compris l'échantillonnage, préparation de l'échantillon et l'analyse chromatographique. Du fait que les phtalates sont largement utilisés, ils sont présents dans l'air, dans l'eau, dans des solvants organiques, dans des matières plastiques, adsorbés sur verre ou d'autres matériaux, etc. (He et al., 2015) Certaines sources typiques de contamination sont répertoriées ci-dessous et des recommandations sont données pour minimiser la contamination. (Kumar and Sivaperumal, 2016, Dewalque et al., 2014c)

-Les phtalates sont également présents dans le système chromatographique et la contamination se trouve dans le système d'entrée et de l'approvisionnement en gaz. Entrées Split / sans division peuvent contenir des cloisons doublures et les joints toriques qui peuvent être contaminés par des phtalates.

Lors de l'injection sans division, un grand nuage de vapeur de solvant est créé et ces vapeurs peuvent échapper à la doublure et effectuer l'extraction de phtalate des cloisons et des joints toriques. Kumar and Sivaperumal, 2016, Dewalque et al., 2014c)

La qualité des bouchons pour flacons échantillonneurs automatiques est un autre facteur essentiel ; ces plafonds peuvent également contenir des phtalates parce que si le bouchon du flacon a été perforé, les phtalates sont libérés dans l'échantillon (dans le solvant organique) Les multi-injections du même échantillon couramment utilisées pour les études devraient également être évitées. (Yue et al., 2014, Dewalque et al., 2014c)

VI. Normes et réglementation :

Les études animales et humaines ont attiré l'attention des autorités sanitaires, des organismes de réglementation et du public sur les effets nocifs potentiels des phtalates sur la santé. Par conséquent, plusieurs mesures et réglementations ont été prises pour réduire l'exposition humaine aux phtalates. (Zaki, 2015)

En Algérie, il n'y a aucune réglementation qui régit l'utilisation de plastique dans le domaine alimentaire mise à part l'article 14 de l'arrêté du 24 Rabie Ethani 1421 correspondant au 26 Juillet 2000 relatif aux spécifications des eaux de boisson préemballées. Les phtalates, particulièrement le DEHP, figurent dans la liste des substances « dangereuses prioritaires » de la DCE établit par l'Union Européenne. De nombreux textes européens ont traités, au cours de ces dix dernières années, la question de l'utilisation de certains phtalates dans les biens de consommation courante et dans les produits de santé, visant majoritairement les phtalates en tant que plastifiant. (Ventrice et al., 2013)

VI.1 La réglementation européenne :

La réglementation concernant le classement des substances chimiques est issue de la directive 67/548/CEE. (Sandra, 2014)

VI.1.1 Le classement des phtalates :

Le classement est publié sous la forme d'une Adaptation au Progrès Technique par la mise à jour de l'annexe I de la directive 67/548/CEE, remplacée depuis le 20 janvier 2009 par le

règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges.

Il a pour objectif d'adapter le système de classification de l'UE au système général harmonisé (SGH) des Nations Unies et prévoit la mise en place d'un inventaire des classifications et des étiquetages des substances, ainsi que la mise en conformité des étiquettes et des fiches de données sécurité avec le SGH avant le 1^{er} décembre 2010 pour les substances et le 1^{er} juin 2015 pour les mélanges.

La classification CMR (cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction) prévoit trois niveaux de risque par agent. (Sandra, 2014)

Tableau X : Comparatif de la classification des substances CMR

| | <i>Directive 67/548 CE (France : arrêté du 20 Avril 2004, annexe 1)</i> | <i>Règlement CLP Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures ; règlement, basé sur les recommandations internationales du SGH (obligatoire à partir du 01/12/2010 pour les substances et du 01/06/2015 pour les mélanges.</i> |
|--|---|--|
| <i>Avéré pour l'homme</i> | 1 | 1A |
| <i>Avéré pour l'animal et suspecté pour l'homme</i> | 2 | 1B |
| <i>Suspect-Doute en l'absence d'informations sérieuses disponibles</i> | 3 | 2 |

Certains phtalates font l'objet d'un classement comme substance à risque reprotoxique (effets néfastes sur la fonction sexuelle et la fertilité ; effets néfastes sur le développement des descendants).

Il s'agit du DEHP, BBP, DIPP, DIBP, DMEP, DnPP et DBP qui sont classés Repro2 selon la directive 67/548/CEE et Repro1B selon le règlement 1272/2008.

Ainsi, au niveau reprotoxicité, on peut retenir 5 classes :

- R60 : Peut altérer la fertilité.
- R61 : Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant.
- R62 : Risque possible d'altération de la fertilité.
- R63 : Risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant.
- R64 : Risque possible pour les bébés nourris au lait maternel

Au niveau des dangers pour l'environnement, deux classes sont concernées :

- R50 : Très toxique pour les organismes aquatiques.
- R53 : Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

Enfin, au niveau des dangers pour la santé, une classe est mentionnée :

- R22 : Nocif en cas d'ingestion

Tableau XI : Classification des phtalates en tant que CMR

| Identification | Classification et étiquetage harmonisés européens des phtalates comme substances CMR (Critères CLP) | | Classification et étiquetage harmonisés européens des phtalates (Critères de DSD) Directive Substances dangereuses ; Système européen d'étiquetage basé sur la directive 67/548 CEE | |
|----------------|---|--|---|--|
| | Classification Code(s) des classes et catégories de danger | | Classification | |
| DMEP | Repr. 1B | | Repr. Cat 2 ; R61 | Repr. Cat 3 ; R62 |
| DEHP | Repr. 1B | | Repr. Cat 2 ; R60-61 | |
| DBP | Repr. 1B Aquatic Acute 1 | | Repr. Cat 2 ; R61 | Repr. Cat 3 ; R62 N ; R50 |
| DnPP | Repr. 1B | | Repr. Cat 2 ; R60-61 | |
| DIPP | Aquatic Acute 1 | | N ; R50 | |
| BBP | Repr. 1B Aquatic Acute 1 Chronic 1 | | Aquatic | Repr. Cat 2 ; R61 Repr. Cat 3 ; R62 N ; R50-53 |
| DIBP | Repr. 1B | | Repr. Cat 2 ; R61 Repr. Cat 3 ; R62 | |
| DAP | Acute Tox. 4 Aquatic Acute 1 Chronic 1 | | Aquatic | Xn ; R22 N ; R50-53 |

VI.1.2 La réglementation par domaine :

VI.1.2.1 Jouets et articles de puériculture :

En 1999, la Commission européenne a interdit temporairement l'utilisation de certains phtalates (DINP, DEHP, DBP, DIDP, DNOP, BBP) Dans les jouets et articles de puériculture susceptibles d'être portés à la bouche par les enfants de moins de trois ans en raison de leurs effets potentiels sur la santé humaine. Actuellement, les phtalates sont autorisés dans certaines proportions par la Directive 2005/84/CE du Parlement Européen et sa déclinaison en loi française par Décret n°2006---1361 du 9/11/2006, consolidée le 16/01/2007 qui stipule que :

- Le DEHP, le DBP et le BBP ne peuvent pas être utilisés comme substances ou composants de préparation à des concentrations supérieures à 0,1% en masse de matière plastifiée.(Almeras et al., 2010)

VI.1.2.2 Le matériel médical :

Les phtalates (principalement le DEHP) sont présents dans de nombreux dispositifs médicaux. Certains phtalates (ex : DEHP, DBP, BBP) sont connus pour leur toxicité et sont classés avec les produits cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction (CMR) de catégorie 2, selon la Directive 67/548/CEE.

La directive européenne 2007/47/CE, entrée en vigueur le 21 mars 2010 et modifiant la directive européenne 93/42/CEE relative à la mise sur le marché des dispositifs médicaux, impose de nouvelles exigences pour les fabricants de certains dispositifs médicaux incluant des phtalates, classés CMR 1 ou 2. Cette disposition comprend deux volets :

-Le premier volet porte sur le renforcement de l'étiquetage pour lequel un symbole spécifique indiquant la présence de phtalates a été créé.

-Le second volet porte sur l'obligation de justifier l'intérêt de la présence de ces substances, dès lors que le dispositif est destiné à être utilisé vers des populations à risque.(Almeras et al., 2010)

VI.1.2.3 Les matériaux de contact alimentaire :

La Directive européenne 2007/19/EC de la commission du 30 mars 2007 modifie la directive 2002/72/CE concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires. Elle fixe des Limites de Migration Spécifiques inférieures au taux de migration globale.

Le règlement européen UE 10/2011 a établi des limites de migration spécifiques (LMS) pour les phtalates utilisés dans les matériaux en contact avec les aliments. Il existe une limite de migration spécifique totale (LMS(T) exprimée en mg de substance par kg de denrée alimentaire) qui concerne l'ensemble des phtalates listés dans le règlement (UE) n°10/2011.

LMS(T) Phtalates = 60 mg/kg d'aliment

D'autre part, chaque phtalate présente également une limite de migration spécifique (LMS). Ces LMS s'appuient sur des VTR (valeurs toxicologiques de référence) figurant dans les opinions de l'EFSA 241-245 de 2005.(Zaki, 2015, Sandra, 2014)

Tableau XII : restrictions d'emploi des phtalates dans les matières plastiques

| Phtalate autorisée | Limite de migration spécifique (LMS) | Restrictions & Spécifications |
|--------------------|--------------------------------------|--|
| DBP | 0,3 mg/kg d'aliments | À employer uniquement comme : - plastifiant dans des matériaux et des objets réutilisables en contact avec des denrées alimentaires non grasses. - auxiliaire technologique dans des polyoléfinés à des concentrations pouvant aller jusqu'à 0,05 % dans le produit final |
| DEHP | 1,5 mg/kg d'aliments | À employer uniquement comme : - plastifiant dans des matériaux et des objets réutilisables en contact avec des denrées alimentaires non grasses. - auxiliaire technologique à des concentrations pouvant aller jusqu'à 0,1 % dans le produit final. |
| BBP | 30 mg/kg d'aliments | À employer uniquement comme : - plastifiant dans des matériaux et des objets réutilisables. - plastifiant dans des matériaux et des objets à usage unique en contact avec des denrées alimentaires non grasses à l'exception des préparations pour nourrissons et préparations de suite, de préparations à base de céréales et des aliments pour enfant e bas âges au sens de la directive 2006/125/CE. - auxiliaire technologique à des concentrations pouvant aller jusqu'à 0,1 % dans le produit final |

Étant donné que les aliments sont la principale source d'exposition humaine aux phtalates, des règles et des mesures spécifiques ont été établies pour minimiser le risque de contamination des aliments par les phtalates. L'US EPA a réglementé le niveau maximal de contaminants de 6 µg/l pour le DEHP dans l'eau potable. Récemment, la FDA des États-Unis a établi le même niveau maximum de 6 µg/l pour le DEHP dans l'eau en bouteille (FDA, 2011). Enfin, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a établi des limites journalières tolérables (DJT) pour certains types de phtalates dans les aliments.

Tableau XIII : Valeurs de l'apport quotidien tolérable de phtalates établies par l'EFSA

| Phtalates | Apport journalier tolérable (TDI) <i>mg/kg /poids /jour</i> |
|-------------|--|
| DBP | 0.01 |
| BBzP | 0.5 |
| DEHP | 0.05 |

VI.1.2.4 Dans les produits cosmétiques :

Le Règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques remplace la Directive « cosmétiques » et stipule que 8 phtalates (DBP, DEHP, BBP, DMEP, DNPP, DIPP, DPP et DIBP), sont interdits dans les produits cosmétiques :

- Le phtalate de butyle benzyle,
- Le phtalate de l'ester dipentylique (ramifié et linéaire),
- Le phtalate de l'acide 1,2-benzene-dicarboxylique,
- Le phtalate de di-n-pentyle,
- Le phtalate de diisopentyle,
- Le phtalate de bis (2-éthylhexyle),
- Le phtalate de bis (2-méthoxyéthyle),
- Le phtalate de dibutyle

Cependant, dans le cadre du règlement REACH, quatre phtalates dont le DEHP, BBP, DBP et DIBP ont été inscrits, le 24 février 2011 à l'annexe XIV du règlement REACH comme substances très préoccupantes soumises à autorisation. Ils ne pourront donc plus être fabriqués ou importés s'ils n'ont pas obtenu, pour un usage bien défini, une autorisation spécifique de la Commission européenne le 21 février 2015.

Ce règlement prévoit donc la possibilité d'autoriser l'utilisation de substance classées comme CMR de catégorie 2 lorsque, au vu de l'exposition et de la concentration, elles ont été considérées comme sûres pour un emploi dans les produits cosmétiques par le CSSC (Comité Scientifique Européen pour la Sécurité des Consommateurs). Les phtalates DEHP, BBP, DBP et DIBP figurent sur cette liste mais aussi sur la liste des substances autorisées.

Cela signifie qu'à partir de février 2015, leur utilisation ne sera permise sans l'autorisation préalable dans un cadre spécifié. (Sandra, 2014)

Les phtalates à chaîne courte seront retirés de l'Union Européenne à partir de février 2015, sans une autorisation délivrée par REACH aux producteurs avant juillet 2013 et garantie par les autorités européennes

En Europe, les phtalates courts ont été interdits pour la fabrication des jouets, articles pour enfants et produits cosmétiques, depuis des années.

Le seul phtalate qui reste utilisé dans les produits cosmétiques, le DEP, a pour fonction de rendre l'alcool impropre.

Les différentes évaluations menées au niveau européen ont toutes conclu à son innocuité dans le cadre d'un usage cosmétique.

En France, on propose l'interdiction d'utiliser le DEHP dans les produits cosmétiques, de restreindre l'usage du DBP et du BBP aux vernis à ongles et d'autoriser une concentration maximale de 15% de DEP dans les produits destinés à un usage externe sur le corps et le visage, à l'exception des parfums.²⁷ Cependant le DEHP devrait être interdit à toute utilisation en 2015.(Sandra, 2014)

VI.2 La réglementation au Canada :

Santé Canada a récemment annoncé des mesures réglementant six phtalates des jouets pour enfant et articles de puériculture en vinyle souple.

Le vinyle dont un jouet ou un article de puériculture est composé ne peut contenir, lors de sa mise à l'essai selon une méthode conforme aux bonnes pratiques de laboratoire, une concentration supérieure à 1000 mg/kg de phtalate de di(2-éthylhexyle) (DEHP), de phtalate de dibutyle (DBP) ou de phtalate de benzyle et de butyle (BBP).(Environnementale and des Consommateurs, 2004)

La partie composée de vinyle d'un jouet ou d'un article de puériculture qui peut d'une manière raisonnablement prévisible être placée dans la bouche d'un enfant de moins de quatre ans ne peut contenir, lors de sa mise à l'essai selon une méthode conforme aux bonnes pratiques de laboratoire, une concentration supérieure à 1000mg/kg de phtalate de diisononyle (DINP), de phtalate de diisodécyle (DIDP) ou de phtalate de di-n-octyle (DNOP).

En 2011, le gouvernement du Canada a publié une étude sur les concentrations de phtalates et l'exposition dermique possible découlant de leur présence dans les cosmétiques et les produits de soins personnels. Selon cette étude, seuls le DEP et le DBP sont présents en quantité importante dans les produits cosmétiques.

L'exposition générale aux phtalates découlant de l'utilisation de cosmétiques et de produits de soins personnels est faible et, par conséquent, il est peu probable qu'elle pose des risques pour la santé des consommateurs canadiens.

Selon Santé Canada le DBP dans les cosmétiques ne représenterait pas de risque pour la santé lorsque la concentration est inférieure à 10 % dans le produit. (Bergé, 2012)

Le gouvernement du Canada a évalué le phtalate de bis (2-éthylhexyle) et a conclu que la substance « peut pénétrer dans l'environnement en quantité ou dans des conditions qui peuvent constituer un danger pour la santé humaine au Canada ».

Bien que Santé Canada n'ait pas relevé la présence de cette substance dans les cosmétiques au Canada, celle-ci est utilisée dans d'autres pays comme ingrédient cosmétique.

Elle a donc été ajoutée à la Liste critique des ingrédients afin d'aviser les fabricants qu'ils ne doivent pas l'utiliser dans la fabrication des produits cosmétiques. (Sandra, 2014)

Chapitre II : Etude Pratique

I. Objectifs

I.1 Objectif principal

L'utilisation du plastique par notre population croît régulièrement ces dernières années. L'omniprésence de ce produit dans notre vie quotidienne et spécialement dans nos produits de consommation, suscite certaines inquiétudes. En absence des travaux visant l'évaluation le taux d'imprégnation des phtalates, une étude dans ce sens s'avère nécessaire qui a pour objective :

- Estimer l'exposition journalière aux phtalates chez la population par le dosage de leurs biomarqueurs urinaires.

I.2 Objectifs secondaires

- Déterminer les teneurs en phtalates dans l'eau destinée à la consommation.
- Proposer des mesures préventives pour diminuer l'exposition de la population aux phtalates.

II. Matériel et méthodes

II.1 Type d'étude :

Il s'agit d'une étude descriptive transversale à viser analytique faite sur un échantillon aléatoire sur une période d'une année allant du mois d'avril 2018 jusqu'au mois d'avril 2019.

II.2 Échantillonnage :

II.2.1 Population d'étude :

Les participants à cette étude demeurent dans la ville d'Oran et la ville de Tlemcen, il s'agit de deux cent quatorze (214) volontaires de tout âge confondu.

➤ Critères d'inclusion :

Les sujets inclus sont :

- Âgés au moins d'un an.

➤ Critères d'exclusion :

Sont exclus de notre étude :

- État de santé nécessitant une nutrition artificielle ;
- Les travailleurs de l'industrie des matières plastiques ;
- Les sujets souffrant d'une insuffisance rénale et/ ou hépatique

II.2.2 Eau destinée à la consommation :

- Six marques différentes d'eau embouteillée algérienne ont été sélectionnées pour cette étude.
- Tous les échantillons ont été emballés dans des bouteilles en plastique PET. Les marques ont été codées de A à F.

II.3 Recueil d'information :

Le recueil d'information a été fait à l'aide d'un questionnaire préétabli (annexe N° 1), après avoir expliqué l'objectif de l'étude.

Ce dernier comprenant 23 questions à choix simple ou multiple.

Le questionnaire est réparti en trois rubriques

Première rubrique : comporte des questions sur les informations sociodémographiques (age, sexe, niveau d'instruction...)

Deuxième rubrique : concerne les informations sur la santé (notion de tabagisme, antécédents médicaux, ...)

Troisième rubrique : s'intéresse plus particulièrement à la nature et le mode de conservation d'eau consommée.

II.4 Éthique :

Les sujets inclus ont été informés du protocole de l'étude et un consentement oral et éclairé a été obtenu de leur part afin d'y participer.

II.5 Déroulement de l'étude :

II.5.1 Paramètres à doser :

II.5.1.1 Prélèvements biologiques

- Bilan biochimique :** l'objectif de ce bilan est d'éliminer toute pathologie pouvant avoir un effet sur le métabolisme des phtalates.
- Créatinine urinaire :** le dosage de la créatininurie a été réalisé pour chaque sujet.
- Les métabolites des phtalates :**

L'estimation de la dose journalière de cinq phtalates, en prenant en compte toutes les sources d'exposition, a été effectuée par le dosage de leurs métabolites urinaires qui sont :

- DnBp : *Le métabolite est mono-n-butyl phtalate.*
- BBzP : *Le métabolite est monobrnzylique phtalate.*
- DEHP : *Les métabolites sont : Le mono-2-ethylhexyle phtalate ; Mono -2- ethyl-5-hydroxyhexyle 5-OH-MEHP et Mono -2- ethyl-5- oxohexyl phtalate de 5-oxo-MEHP.*

- DEP : *Le métabolite est monoethyl phtalate.*
- DBP : *Le métabolite est Mono-n-butyl phtalate*

Au total Sept (07) métabolites ont été recherchés pour chaque sujet.

II.5.1.2 Prélèvement d'eau

Le dosage de cinq (05) phtalates a été effectué pour chaque marque d'eau :

1. Phtalate de di-n-butyle (DnBp)
2. Phtalate de benzylbutyle (BBzP)
3. Phtalate de di-2- ethylhexyle (DEHP)
4. Phtalate de diisobutyle (DiBP)
5. Phtalate de diethyle (DEP)

L'étape pré-analytique pour le dosage des phtalates et leurs métabolites a été réalisée au niveau du laboratoire de toxicologie du département de pharmacie faculté de médecine de Tlemcen et le laboratoire de recherche santé environnement d'Oran. L'analyse a été effectuée au niveau du Centre National des Recherches, Institut sur la Pollution Atmosphérique, Montelibretti RM, Italie.

Pour le bilan biochimique ainsi que la créatine urinaire ont été effectués au niveau du laboratoire de service de néphrologie de la wilaya de Tlemcen.

II.5.2 Prélèvements et conservation :

II.5.2.1 Prélèvements biologiques

Deux prélèvements ont été effectués pour chaque sujet

- Un prélèvement urinaire : les urines du matin ont été recueilli dans des flacons en polypropylène qui ont été par la suite aliquotés et stocké à -70°C jusqu'au moment de l'analyse pour le dosage des métabolites des phtalates,
Le dosage de la créatinine urinaire a été réalisé dans les 48h suivant le prélèvement
- Un prélèvement sanguin recueilli sur tube hépariné pour un bilan biochimique, le dosage a été réalisé dans les 24h

II.5.2.2 Prélèvement d'eau

Pour chaque marque d'eau, trois (03) lots identiques ont été achetés dans différents points de commerce.

L'analyse a été effectuée selon différentes mode de conservation :

- Immédiatement : Les échantillons ont été analysés directement après l'achat.
- Après 1 mois de conservation à deux températures différentes :

- Les échantillons ont été stockés à l'extérieur et exposés directement au soleil entre le mois de mai et le mois de juin 2018. La température variée de +24 à + 25° C.
- Les échantillons ont été conservés au réfrigérateur à une température de + 4 °C.

Pour chaque condition, trois bouteilles de 1,5 L de chaque marque ont été analysées.

II.5.3 Dosage des phtalates :

II.5.3.1 Verrerie :

Un soin particulier a été pris pour réduire le risque de contamination par les phtalates.

- L'utilisation de matières plastiques a été complètement évitée lors de l'analyse.
- Tous les objets en verre, tel que les tubes coniques à centrifuger de 15ml et les ampoules à décanter de 1L, ont été soigneusement lavés trois fois avec de l'eau, l'acétone et ensuite deux fois par le dichlorométhane

II.5.3.2 Matériels :

- Seringues d'injection manuelle de HAMILTON
- Centrifugeuse **SCIOLOGEX**[®]
- Agitateur vortex **kartell**[®]
- pH mètre **Adwa**[®]
- Bain marie **wisd**[®]
- Générateur d'azote **ALLIANCE**[®]
- Balance **OHAUS**[®]

II.5.3.3 Produits chimiques et réactifs :

Acétate d'ammonium **MERCK**[®]

β glucuronidase **sigma**[®]

Sulfate de sodium **MERCK**[®]

Chlorure de sodium **sigma**[®]

Acide acétique **MERCK**[®]

Hexane grade HPLC **sigma**[®]

Éther grade HPLC **sigma**[®]

Chloroforme grade HPLC **sigma**[®]

Dichlorométhane grade HPLC **sigma**[®]

Acétone grade HPLC **sigma**[®]

Acétonitrile grade HPLC **sigma**[®]

Toluène **VWR**[®]

Méthanol **VWR**[®]

BSFTA + TMCS ,99 :1 *sigma*[®]

Eau ultra pure

Les standards étaient de haute pureté (> 98%) :

- Mono benzyl phtalate *sigma*[®]
- Mono butyl phtalate *sigma*[®]
- Mono 2ethyl-hexyl ester *sigma*[®]
- Mono ethyl phtalate, *chiron us*[®]
- Mono 2ethyl 5 hydroxy hexyl *chiron us*[®]
- Mono2ethyl5 oxohexyl phtalates *chiron us*[®]
- Diphenyl phtalate *sigma*[®]
- Dipropyl phtalate *sigma*[®]
- Diéthyl phtalate *sigma*[®]
- Dibutyl phtalate *sigma*[®]
- Butyl benzyl phtalate *sigma*[®]
- Di-2- éthyle hexyl phtalate *sigma*[®]
- Diisobutyle phtalate *sigma*[®]

II.5.3.4 Préparations des solutions :

a. Solution mère :

➤ La solution mère des métabolites de phtalates :

La solution mère contenant 10 mg/l de chaque métabolite a été préparée à partir des solutions étalons. C'est une mixture de six (06) métabolites concentrés chacun à 1000mg/L dans l'acétonitrile.

➤ La solution mère de phtalates :

La solution mère contenant 10 mg/l de chaque phtalate a été préparée à partir des solutions étalons. C'est une mixture de cinq (05) phtalates concentrés chacun à 1000mg/L dans l'acétonitrile.

b. Solution de travail :

Pour les phtalates et les métabolites, la solution du travail a été concentrée à 1mg/l (1ppm) par dilution au 1/10^{ème} de la solution mère.

c. Solution d'étalon interne :

Deux étalons internes ont été utilisés pour le dosage des phtalates et leurs métabolites, à savoir le diphenyl phtalate et le dipropyl phtalate.

Des solutions de 1000mg/l de chaque produit ont été préparées dans l'acétonitrile. Une solution de travail concentrée à 10 mg/l a été préparée par dilution des deux solutions au 1/100^{ème}.

L'étalon interne a été additionné aux différentes solutions d'étalonnages ainsi que les échantillons en tenant compte de l'effet de dilution de tel façon à obtenir une concentration finale de 0,5 µg/l (500 ppb) d'étalon interne.

Toutes les solutions préparées ont été stockées dans des flacons en verre à une température de +4°C.

Références Bibliographique

- ADEYEMI, O., OGinni, O., OSUBOR, C., OLOYEDE, O., OLADIJI, A. & ADEBAYO, E. 2009a. Effect of water contaminated with phthalate, benzene and cyclohexane on *Clarias gariepinus*' cellular system. *Food and chemical toxicology*, 47, 1941-1944.
- ADEYEMI, O., OGinni, O., OSUBOR, C. C., OLOYEDE, O. B., OLADIJI, A. T. & ADEBAYO, E. A. 2009b. Effect of water contaminated with phthalate, benzene and cyclohexane on *Clarias gariepinus*' cellular system. *Food Chem Toxicol*, 47, 1941-4.
- AKINGBEMI, B. T., GE, R., KLINEFELTER, G. R., ZIRKIN, B. R. & HARDY, M. P. 2004. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 775-780.
- AL-SALEH, I., SHINWARI, N. & ALSABBAHEEN, A. 2011. Phthalates residues in plastic bottled waters. *The Journal of toxicological sciences*, 36, 469-478.
- ALMERAS, C., CACAN, Y., GÉREEC, V. & MILLET, M. 2010. Projet PERSAN les phtalates. *Ecole des hautes études en santé publique (EHESP)*.
- ANDERSON, W. A., CASTLE, L., HIRD, S., JEFFERY, J. & SCOTTER, M. J. 2011. A twenty-volunteer study using deuterium labelling to determine the kinetics and fractional excretion of primary and secondary urinary metabolites of di-2-ethylhexylphthalate and di-iso-nonylphthalate. *Food and chemical toxicology*, 49, 2022-2029.
- ARAKI, A., MITSUI, T., MIYASHITA, C., NAKAJIMA, T., NAITO, H., ITO, S., SASAKI, S., CHO, K., IKENO, T. & NONOMURA, K. 2014. Association between maternal exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormone levels in fetal blood: the Hokkaido study on environment and children's health. *PLoS one*, 9.
- ASHLEY-MARTIN, J., DODDS, L., LEVY, A. R., PLATT, R. W., MARSHALL, J. S. & ARBUCKLE, T. E. 2015. Prenatal exposure to phthalates, bisphenol A and perfluoroalkyl substances and cord blood levels of IgE, TSLP and IL-33. *Environmental research*, 140, 360-368.
- BAGEL, S., DÉCAUDIN, B., NEUVILLE, S., CHOPINEAU, J., ODOU, P. & SAUTOU, V. 2011. Les phtalates dans les dispositifs médicaux destinés à la nutrition artificielle. *Nutrition clinique et métabolisme*, 25, 15-23.
- BARLOW, C. & MORGAN, D. 2013. Polymer film packaging for food: An environmental assessment. *Resources, Conservation and Recycling*, 78, 74-80.
- BARTHÉLÉMY, E., LAFON, D., FRÉMY, J. & FEIGENBAUM, A. 2007. Les matériaux au contact des aliments: réglementation et évaluation des risques sanitaires pour les consommateurs. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*, 68, 267-278.
- BENJAMIN, S., MASAI, E., KAMIMURA, N., TAKAHASHI, K., ANDERSON, R. C. & FAISAL, P. A. 2017. Phthalates impact human health: Epidemiological evidences and plausible mechanism of action. *J Hazard Mater*, 340, 360-383.
- BENJAMIN, S., PRADEEP, S., JOSH, M. S., KUMAR, S. & MASAI, E. 2015a. A monograph on the remediation of hazardous phthalates. *Journal of hazardous materials*, 298, 58-72.
- BENJAMIN, S., PRAKASAN, P., SREEDHARAN, S., WRIGHT, A.-D. G. & SPENER, F. 2015b. Pros and cons of CLA consumption: an insight from clinical evidences. *Nutrition & metabolism*, 12, 4.

- BENJAMIN, S. & SPENER, F. 2009. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutrition & Metabolism*, 6, 36.
- BERGÉ, A. 2012. *Identification des sources d'alkylphénols et de phtalates en milieu urbain: comparaison des rejets à dominante urbaine (domestique) par rapport à des rejets purement industriels.*
- CAI, H., ZHENG, W., ZHENG, P., WANG, S., TAN, H., HE, G. & QU, W. 2015. Human urinary/seminal phthalates or their metabolite levels and semen quality: A meta-analysis. *Environ Res*, 142, 486-94.
- CARIOU, R., LARVOR, F., MONTEAU, F., MARCHAND, P., BICHON, E., DERVILLY-PINEL, G., ANTIGNAC, J.-P. & LE BIZEC, B. 2016. Measurement of phthalates diesters in food using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Food chemistry*, 196, 211-219.
- CHANG, Y.-J., LIN, K.-L. & CHANG, Y.-Z. 2013. Determination of Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) metabolites in human hair using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 420, 155-159.
- CHANTAL, M. 2011. <Bisphenol A et phtalates effets biologiques et fenetres d'exposition à risque>. percentile, 2011.
- CHEN, F.-P. & CHIEN, M.-H. 2014. Lower concentrations of phthalates induce proliferation in human breast cancer cells. *Climacteric*, 17, 377-384.
- CHRISTENSEN, K. L. Y., LORBER, M., KOCH, H. M., KOLOSSA-GEHRING, M. & MORGAN, M. K. 2012. Population variability of phthalate metabolites and bisphenol A concentrations in spot urine samples versus 24-or 48-h collections. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 22, 632-640.
- CIRILLO, T., FASANO, E., ESPOSITO, F., MONTUORI, P. & AMODIO COCCHIERI, R. 2013. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and di-n-butylphthalate (DBP) exposure through diet in hospital patients. *Food Chem Toxicol*, 51, 434-8.
- CLARK, K. E., DAVID, R. M., GUINN, R., KRAMARZ, K. W., LAMPI, M. A. & STAPLES, C. A. 2011. Modeling human exposure to phthalate esters: a comparison of indirect and biomonitoring estimation methods. *Human and ecological risk assessment: an international journal*, 17, 923-965.
- DADA, E. O. & IKEH, R. K. 2018. Phthalate and metal concentrations in drinking water in Lagos, Nigeria. *Journal of Health and Pollution*, 8, 180603.
- DEKEYSER, J. G., LAURENZANA, E. M., PETERSON, E. C., CHEN, T. & OMIECINSKI, C. J. 2011. Selective phthalate activation of naturally occurring human constitutive androstane receptor splice variants and the pregnane X receptor. *Toxicological Sciences*, 120, 381-391.
- DESVERGNE, B., FEIGE, J. N. & CASALS-CASAS, C. 2009. PPAR-mediated activity of phthalates: a link to the obesity epidemic? *Molecular and cellular endocrinology*, 304, 43-48.
- DEWALQUE, L., CHARLIER, C. & PIRARD, C. 2014a. Estimated daily intake and cumulative risk assessment of phthalate diesters in a Belgian general population. *Toxicology letters*, 231, 161-168.
- DEWALQUE, L., PIRARD, C. & CHARLIER, C. 2014b. Measurement of urinary biomarkers of parabens, benzophenone-3, and phthalates in a Belgian population. *BioMed research international*, 2014.
- DEWALQUE, L., PIRARD, C., DUBOIS, N. & CHARLIER, C. 2014c. Simultaneous determination of some phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in urine by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 949, 37-47.

- DIEZI, J. 2009. Perturbateurs endocriniens: considérations générales, et exemples du Bisphénol A et des phtalates.
- DIRTU, A. C., GEENS, T., DIRINCK, E., MALARVANNAN, G., NEELS, H., VAN GAAL, L., JORENS, P. G. & COVACI, A. 2013. Phthalate metabolites in obese individuals undergoing weight loss: urinary levels and estimation of the phthalates daily intake. *Environment international*, 59, 344-353.
- DOMÍNGUEZ-MORUECO, N., GONZÁLEZ-ALONSO, S. & VALCÁRCEL, Y. 2014. Phthalate occurrence in rivers and tap water from central Spain. *Science of the total environment*, 500, 139-146.
- EJAREDAR, M., NYANZA, E. C., TEN EYCKE, K. & DEWEY, D. 2015. Phthalate exposure and childrens neurodevelopment: a systematic review. *Environmental research*, 142, 51-60.
- ENVIRONNEMENTALE, S. & DES CONSOMMATEURS, S. 2004. Liste critique des ingrédients dont l'utilisation est restreinte ou interdite dans les cosmétiques (liste critique)-Santé Canada.
- FAN, Y., QIN, Y., CHEN, M., LI, X., WANG, R., HUANG, Z., XU, Q., YU, M., ZHANG, Y., HAN, X., DU, G., XIA, Y., WANG, X. & LU, C. 2019. Prenatal low-dose DEHP exposure induces metabolic adaptation and obesity: Role of hepatic thiamine metabolism. *J Hazard Mater*, 121534.
- FIERENS, T., SERVAES, K., VAN HOLDERBEKE, M., GEERTS, L., DE HENAUW, S., SIOEN, I. & VANERMEN, G. 2012a. Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2575-2583.
- FIERENS, T., VAN HOLDERBEKE, M., WILLEMS, H., DE HENAUW, S. & SIOEN, I. 2012b. Phthalates in Belgian cow's milk and the role of feed and other contamination pathways at farm level. *Food and chemical toxicology*, 50, 2945-2953.
- FIERENS, T., VANERMEN, G., VAN HOLDERBEKE, M., DE HENAUW, S. & SIOEN, I. 2012c. Effect of cooking at home on the levels of eight phthalates in foods. *Food Chem Toxicol*, 50, 4428-35.
- FREDERIKSEN, H., AKSGLAEDE, L., SORENSEN, K., SKAKKEBAEK, N. E., JUUL, A. & ANDERSSON, A.-M. 2011. Urinary excretion of phthalate metabolites in 129 healthy Danish children and adolescents: estimation of daily phthalate intake. *Environmental research*, 111, 656-663.
- FREDERIKSEN, H., KUIRI-HÄNNINEN, T., MAIN, K. M., DUNKEL, L. & SANKILAMPI, U. 2014. A longitudinal study of urinary phthalate excretion in 58 full-term and 67 preterm infants from birth through 14 months. *Environmental health perspectives*, 122, 998-1005.
- FREDERIKSEN, H., SKAKKEBAEK, N. E. & ANDERSSON, A. M. 2007. Metabolism of phthalates in humans. *Molecular nutrition & food research*, 51, 899-911.
- GAO, J. & CHI, J. 2015. Biodegradation of phthalate acid esters by different marine microalgal species. *Marine pollution bulletin*, 99, 70-75.
- GAO, Y., AN, T., JI, Y., LI, G. & ZHAO, C. 2015. Eco-toxicity and human estrogenic exposure risks from OH-initiated photochemical transformation of four phthalates in water: a computational study. *Environmental Pollution*, 206, 510-517.
- GAUDIN, R., MARSAN, P., NDAW, S. & ROBERT, A. Surveillance biologique de l'exposition au phtalate de di-(2-éthylhexyle)(DEHP). *130 Avril*, 201329.
- GE, R.-S., CHEN, G.-R., TANRIKUT, C. & HARDY, M. P. 2007. Phthalate ester toxicity in Leydig cells: developmental timing and dosage considerations. *Reproductive Toxicology*, 23, 366-373.

- GRIES, W., ELLRICH, D., KÜPPER, K., LADERMANN, B. & LENG, G. 2012. Analytical method for the sensitive determination of major di-(2-propylheptyl)-phthalate metabolites in human urine. *Journal of Chromatography B*, 908, 128-136.
- GUO, Y. & KANNAN, K. 2012. Challenges encountered in the analysis of phthalate esters in foodstuffs and other biological matrices. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404, 2539-2554.
- GUO, Y., WU, Q. & KANNAN, K. 2011. Phthalate metabolites in urine from China, and implications for human exposures. *Environment international*, 37, 893-898.
- HE, M., YANG, C., GENG, R., ZHAO, X., HONG, L., PIAO, X., CHEN, T., QUINTO, M. & LI, D. 2015. Monitoring of phthalates in foodstuffs using gas purge microsyringe extraction coupled with GC-MS. *Analytica chimica acta*, 879, 63-68.
- HERRERO, L., CALVARRO, S., FERNÁNDEZ, M. A., QUINTANILLA-LÓPEZ, J. E., GONZÁLEZ, M. J. & GÓMARA, B. 2015. Feasibility of ultra-high performance liquid and gas chromatography coupled to mass spectrometry for accurate determination of primary and secondary phthalate metabolites in urine samples. *Analytica chimica acta*, 853, 625-636.
- HERREROS, M. A., GONZALEZ-BULNES, A., IÑIGO-NUÑEZ, S., CONTRERAS-SOLIS, I., ROS, J. M. & ENCINAS, T. 2013. Toxicokinetics of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and its effects on luteal function in sheep. *Reproductive biology*, 13, 66-74.
- HOLAHAN, M. R. & SMITH, C. A. 2015. Phthalates and neurotoxic effects on hippocampal network plasticity. *Neurotoxicology*, 48, 21-34.
- HUANG, T., SAXENA, A. R., ISGANAITIS, E. & JAMES-TODD, T. 2014. Gender and racial/ethnic differences in the associations of urinary phthalate metabolites with markers of diabetes risk: National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2008. *Environ Health*, 13, 6.
- HUFFMAN, A. M., WU, H., ROSATI, A., RAHIL, T., SITES, C. K., WHITCOMB, B. W. & PILSNER, J. R. 2018. Associations of urinary phthalate metabolites and lipid peroxidation with sperm mitochondrial DNA copy number and deletions. *Environmental research*, 163, 10-15.
- INRS 2017. Phthalate de benzyle et de butyle.
- JENSEN, M. S., ANAND-IVELL, R., NØRGAARD-PEDERSEN, B., JÖNSSON, B. A., BONDE, J. P., HOUGAARD, D. M., COHEN, A., LINDH, C. H., IVELL, R. & TOFT, G. 2015. Amniotic fluid phthalate levels and male fetal gonad function. *Epidemiology*, 26, 91-99.
- JEONG, J. Y., LEE, J. H., KIM, E. Y., KIM, P. G. & KHO, Y. L. 2011. Determination of phthalate metabolites in human serum and urine as biomarkers for phthalate exposure using column-switching LC-MS/MS. *Safety and health at work*, 2, 57-64.
- JIANG, J., MU, D., DING, M., ZHANG, S., ZHANG, H. & HU, J. 2018. Simultaneous determination of primary and secondary phthalate monoesters in the Taihu Lake: Exploration of sources. *Chemosphere*, 202, 17-24.
- JOHNS, L. E., COOPER, G. S., GALIZIA, A. & MEEKER, J. D. 2015. Exposure assessment issues in epidemiology studies of phthalates. *Environment international*, 85, 27-39.
- KASHYAP, D. & AGARWAL, T. 2018. Concentration and factors affecting the distribution of phthalates in the air and dust: A global scenario. *Science of the Total Environment*, 635, 817-827.
- KASPER-SONNENBERG, M., KOCH, H. M., WITTSIEPE, J. & WILHELM, M. 2012. Levels of phthalate metabolites in urine among mother-child-pairs—results from the

- Duisburg birth cohort study, Germany. *International journal of hygiene and environmental health*, 215, 373-382.
- KATO, K., SILVA, M. J., NEEDHAM, L. L. & CALAFAT, A. M. 2005. Determination of 16 phthalate metabolites in urine using automated sample preparation and on-line preconcentration/high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 77, 2985-2991.
- KAYALI, N., TAMAYO, F. G. & POLO-DÍEZ, L. M. 2006. Determination of diethylhexyl phthalate in water by solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography. *Talanta*, 69, 1095-1099.
- KIM, M., SONG, N. R., CHOI, J.-H., LEE, J. & PYO, H. 2014. Simultaneous analysis of urinary phthalate metabolites of residents in Korea using isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry. *Science of the total environment*, 470, 1408-1413.
- KIM, S. H. & PARK, M. J. 2014. Phthalate exposure and childhood obesity. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*, 19, 69-75.
- KOCH, H. M., GONZALEZ-RECHE, L. M. & ANGERER, J. 2003. On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *Journal of Chromatography B*, 784, 169-182.
- KOCH, H. M., HALLER, A., WEIß, T., KÄFFERLEIN, H.-U., STORK, J. & BRÜNING, T. 2012. Phthalate exposure during cold plastisol application—a human biomonitoring study. *Toxicology letters*, 213, 100-106.
- KOCH, H. M., WITTASSEK, M., BRÜNING, T., ANGERER, J. & HEUDORF, U. 2011. Exposure to phthalates in 5–6 years old primary school starters in Germany—a human biomonitoring study and a cumulative risk assessment. *International journal of hygiene and environmental health*, 214, 188-195.
- KOSTKA, G., URBANEK-OLEJNIK, K. & WIADROWSKA, B. 2010. Di-butyl phthalate—induced hypomethylation of the c-myc gene in rat liver. *Toxicology and industrial health*, 26, 407-416.
- KRANVOGL, R., KNEZ, J., MIUC, A., VONČINA, E., VONČINA, D. B. & VLAISAVLJEVIĆ, V. 2014. Simultaneous determination of phthalates, their metabolites, alkylphenols and bisphenol A using GC-MS in urine of men with fertility problems. *Acta Chimica Slovenica*, 61.
- KU, H. Y., TSAI, T. L., WANG, P. L., SU, P. H., SUN, C. W., WANG, C. J. & WANG, S. L. 2019. Prenatal and childhood phthalate exposure and attention deficit hyperactivity disorder traits in child temperament: A 12-year follow-up birth cohort study. *Sci Total Environ*, 699, 134053.
- KUKLENYIK, Z., YE, X., NEEDHAM, L. L. & CALAFAT, A. M. 2009. Automated solid-phase extraction approaches for large scale biomonitoring studies. *Journal of chromatographic science*, 47, 12-18.
- KUMAR, A. R. & SIVAPERUMAL, P. 2016. Analytical methods for the determination of biomarkers of exposure to phthalates in human urine samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 75, 151-161.
- KUMAR, N., SRIVASTAVA, S. & ROY, P. 2015. Impact of low molecular weight phthalates in inducing reproductive malfunctions in male mice: Special emphasis on Sertoli cell functions. *Gen Comp Endocrinol*, 215, 36-50.
- LIU, C., DENG, Y.-L., ZHENG, T.-Z., YANG, P., JIANG, X.-Q., LIU, E.-N., MIAO, X.-P., WANG, L.-Q., JIANG, M. & ZENG, Q. 2020. Urinary biomarkers of phthalates exposure and risks of thyroid cancer and benign nodule. *Journal of hazardous materials*, 383, 121189.

- LIU, W. & ZONE, W. F. T. 2008. Determination of sub-ppb level of phthalates in water by auto-SPME and GC-MS. *Agilent Technologies*.
- LORBER, M. & KOCH, H. M. 2013. Development and application of simple pharmacokinetic models to study human exposure to di-n-butyl phthalate (DnBP) and diisobutyl phthalate (DiBP). *Environment international*, 59, 469-477.
- LORBER, M., KOCH, H. M. & ANGERER, J. 2011. A critical evaluation of the creatinine correction approach: can it underestimate intakes of phthalates? A case study with di-2-ethylhexyl phthalate. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 21, 576-586.
- LYCHE, J. L., GUTLEB, A. C., BERGMAN, Å., ERIKSEN, G. S., MURK, A. J., ROPSTAD, E., SAUNDERS, M. & SKAARE, J. U. 2009. Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 12, 225-249.
- MANIKKAM, M., TRACEY, R., GUERRERO-BOSAGNA, C. & SKINNER, M. K. 2013. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PloS one*, 8.
- MARIE, C., VENDITTELLI, F. & SAUVANT-ROCHAT, M.-P. 2015. Obstetrical outcomes and biomarkers to assess exposure to phthalates: a review. *Environment international*, 83, 116-136.
- MEEKER, J. D., SATHYANARAYANA, S. & SWAN, S. H. 2009. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364, 2097-113.
- MOREIRA, M. A., ANDRÉ, L. C. & CARDEAL, Z. L. 2014. Analysis of phthalate migration to food simulants in plastic containers during microwave operations. *International journal of environmental research and public health*, 11, 507-526.
- MUCZYNSKI, V. 2011. *Polluants environnementaux et développement du testicule foetal humain: effets et mécanismes des phtalates*. Paris 11.
- MULLUR, R., LIU, Y.-Y. & BRENT, G. A. 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological reviews*, 94, 355-382.
- NET, S., RABODONIRINA, S., SGHAIER, R. B., DUMOULIN, D., CHBIB, C., TLILI, I. & OUDDANE, B. 2015. Distribution of phthalates, pesticides and drug residues in the dissolved, particulate and sedimentary phases from transboundary rivers (France–Belgium). *Science of the total environment*, 521, 152-159.
- OKOLI, C. P., ADEWUYI, G. O., ZHANG, Q., DIAGBOYA, P. N. & GUO, Q. 2014. Mechanism of dialkyl phthalates removal from aqueous solution using gamma-cyclodextrin and starch based polyurethane polymer adsorbents. *Carbohydr Polym*, 114, 440-9.
- PAN, Y., JING, J., DONG, F., YAO, Q., ZHANG, W., ZHANG, H., YAO, B. & DAI, J. 2015. Association between phthalate metabolites and biomarkers of reproductive function in 1066 Chinese men of reproductive age. *Journal of hazardous materials*, 300, 729-736.
- POCAR, P., FIANDANESE, N., SECCHI, C., BERRINI, A., FISCHER, B., SCHMIDT, J. S., SCHAEDLICH, K. & BORROMEO, V. 2012. 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*, 153, 937-948.
- PRADEAU, D. 2004. MIGRATION DANS LES ALIMENTS DE COMPOSANTS DE MATERIAUX PLASTIQUES. *LES RISQUES ALIMENTAIRES D'ORIGINE CHIMIQUE*.

- PREUSS, R., KOCH, H. M. & ANGERER, J. 2005. Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 816, 269-280.
- QURESHI, M. S., YUSOFF, A. R. B. M., WIRZAL, M. D. H., SIRAJUDDIN, BAREK, J., AFRIDI, H. I. & ÜSTÜNDAG, Z. 2016. Methods for the determination of endocrine-disrupting phthalate esters. *Critical reviews in analytical chemistry*, 46, 146-159.
- RAJESH, P. & BALASUBRAMANIAN, K. 2014. Phthalate exposure in utero causes epigenetic changes and impairs insulin signalling. *J Endocrinol*, 223, 47-66.
- RASTKARI, N. & AHMADKHANIHA, R. 2013. Magnetic solid-phase extraction based on magnetic multi-walled carbon nanotubes for the determination of phthalate monoesters in urine samples. *Journal of chromatography A*, 1286, 22-28.
- RHIM, J.-W., PARK, H.-M. & HA, C.-S. 2013. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in polymer science*, 38, 1629-1652.
- SABAREDZOVIC, A., SAKHI, A. K., BRANTSÆTER, A. L. & THOMSEN, C. 2015. Determination of 12 urinary phthalate metabolites in Norwegian pregnant women by core–shell high performance liquid chromatography with on-line solid-phase extraction, column switching and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1002, 343-352.
- SAILLENFAIT, A.-M. & LAUDET-HESBERT, A. 2005. Phtalates (II). *EMC-Toxicologie-Pathologie*, 2, 137-150.
- SAINT-LAURENT, L. & RHAINDS, M. 2004. Les phtalates: etat des connaissances sur la toxicite et l'exposition de la polulation generale. *Québec: Institut National de Santé Publique*.
- SAKHI, A. K., LILLEGAARD, I. T. L., VOORSPOELS, S., CARLSEN, M. H., LØKEN, E. B., BRANTSÆTER, A. L., HAUGEN, M., MELTZER, H. M. & THOMSEN, C. 2014. Concentrations of phthalates and bisphenol A in Norwegian foods and beverages and estimated dietary exposure in adults. *Environment international*, 73, 259-269.
- SANDRA, G. 2014. Les phtalates. *universite du Quebec*.
- SANTANA, J., GIRAUDI, C., MARENGO, E., ROBOTTI, E., PIRES, S., NUNES, I. & GASPAR, E. M. 2014. Preliminary toxicological assessment of phthalate esters from drinking water consumed in Portugal. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 1380-1390.
- SARATH JOSH, M., PRADEEP, S., BALAN, A. K., SREEJITH, M. & BENJAMIN, S. 2016. Accessing the molecular interactions of phthalates and their primary metabolites with the human pregnane X receptor using in silico profiling. *Journal of Applied Toxicology*, 36, 1599-1604.
- SARATH JOSH, M., PRADEEP, S., VIJAYALEKSHMI AMMA, K., BALACHANDRAN, S., ABDUL JALEEL, U., DOBLE, M., SPENER, F. & BENJAMIN, S. 2014. Phthalates efficiently bind to human peroxisome proliferator activated receptor and retinoid X receptor α , β , γ subtypes: an in silico approach. *Journal of Applied Toxicology*, 34, 754-765.
- SCHANTZ, M. M., BENNER, B. A., HECKERT, N. A., SANDER, L. C., SHARPLESS, K. E., VANDER POL, S. S., VASQUEZ, Y., VILLEGAS, M., WISE, S. A. & ALWIS, K. U. 2015. Development of urine standard reference materials for metabolites of organic chemicals including polycyclic aromatic hydrocarbons, phthalates, phenols, parabens, and volatile organic compounds. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407, 2945-2954.

- SCHENCK, F. J. & LEHOTAY, S. J. 2000. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food? *Journal of chromatography A*, 868, 51-61.
- SERVAES, K., VOORSPOELS, S., LIEVENS, J., NOTEN, B., ALLAERTS, K., VAN DE WEGHE, H. & VANERMEN, G. 2013. Direct analysis of phthalate ester biomarkers in urine without preconcentration: method validation and monitoring. *Journal of Chromatography A*, 1294, 25-32.
- SEVERIN, I., RIQUET, A.-M. & CHAGNON, M.-C. 2011. Évaluation et gestion des risques—Matériaux d'emballage à contact alimentaire. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 46, 59-66.
- SHANLE, E. K. & XU, W. 2011. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chemical research in toxicology*, 24, 6-19.
- SHAPIRO, G., DODDS, L., ARBUCKLE, T., ASHLEY-MARTIN, J., FRASER, W., FISHER, M., TABACK, S., KEELY, E., BOUCHARD, M. & MONNIER, P. 2015. Exposure to phthalates, bisphenol A and metals in pregnancy and the association with impaired glucose tolerance and gestational diabetes mellitus: the MIREC study. *Environment international*, 83, 63-71.
- SHEIKH, I. A. & BÉG, M. A. 2017. Endocrine disruption: In silico interactions between phthalate plasticizers and corticosteroid binding globulin. *Journal of Applied Toxicology*, 37, 1471-1480.
- SICIŃSKA, P. 2018. Di-n-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate and their metabolites induce haemolysis and eryptosis in human erythrocytes. *Chemosphere*, 203, 44-53.
- SILVA, M. J., PREAU JR, J. L., NEEDHAM, L. L. & CALAFAT, A. M. 2008. Cross validation and ruggedness testing of analytical methods used for the quantification of urinary phthalate metabolites. *Journal of Chromatography B*, 873, 180-186.
- SILVA, M. J., SLAKMAN, A. R., REIDY, J. A., PREAU JR, J. L., HERBERT, A. R., SAMANDAR, E., NEEDHAM, L. L. & CALAFAT, A. M. 2004. Analysis of human urine for fifteen phthalate metabolites using automated solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 805, 161-167.
- SOLYMOS, E., GUDDAT, S., GEYER, H., FLENKER, U., THOMAS, A., SEGURA, J., VENTURA, R., PLATEN, P., SCHULTE-MATTLER, M. & THEVIS, M. 2011. Rapid determination of urinary di (2-ethylhexyl) phthalate metabolites based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry as a marker for blood transfusion in sports drug testing. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 401, 517-528.
- SWAN, S. H., MAIN, K. M., LIU, F., STEWART, S. L., KRUSE, R. L., CALAFAT, A. M., MAO, C. S., REDMON, J. B., TERNAND, C. L., SULLIVAN, S. & TEAGUE, J. L. 2005. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect*, 113, 1056-61.
- TAKESHITA, A., INAGAKI, K., IGARASHI-MIGITAKA, J., OZAWA, Y. & KOIBUCHI, N. 2006. The endocrine disrupting chemical, diethylhexyl phthalate, activates MDR1 gene expression in human colon cancer LS174T cells. *Journal of endocrinology*, 190, 897-902.
- TSOCHATZIS, E. D., TZIMOU-TSITOURIDOU, R. & GIKA, H. G. 2017. Analytical methodologies for the assessment of phthalate exposure in humans. *Critical reviews in analytical chemistry*, 47, 279-297.
- UREN-WEBSTER, T. M., LEWIS, C., FILBY, A. L., PAULL, G. C. & SANTOS, E. M. 2010. Mechanisms of toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquatic toxicology*, 99, 360-369.

- VENTRICE, P., VENTRICE, D., RUSSO, E. & DE SARRO, G. 2013. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36, 88-96.
- VÖLKEL, W., KIRANOGLU, M., SCHUSTER, R. & FROMME, H. 2014. Phthalate intake by infants calculated from biomonitoring data. *Toxicology letters*, 225, 222-229.
- WANG, X., WANG, L., ZHANG, J., YIN, W., HOU, J., ZHANG, Y., HU, C., WANG, G., ZHANG, R., TAO, Y. & YUAN, J. 2018. Dose-response relationships between urinary phthalate metabolites and serum thyroid hormones among waste plastic recycling workers in China. *Environ Res*, 165, 63-70.
- WHYATT, R. M., PERZANOWSKI, M. S., JUST, A. C., RUNDLE, A. G., DONOHUE, K. M., CALAFAT, A. M., HOEPNER, L. A., PERERA, F. P. & MILLER, R. L. 2014. Asthma in Inner-City Children at 5–11 Years of Age and Prenatal Exposure to Phthalates: The Columbia Center for Children’s Environmental Health Cohort. *Environmental Health Perspectives*, 122, 1141-1146.
- WU, S., ZHU, J., LI, Y., LIN, T., GAN, L., YUAN, X., XU, M. & WEI, G. 2010. Dynamic effect of di-2-(ethylhexyl) phthalate on testicular toxicity: epigenetic changes and their impact on gene expression. *International journal of toxicology*, 29, 193-200.
- XIE, C., JIN, R., ZHAO, Y., LIN, L., LI, L., CHEN, J. & ZHANG, Y. 2015a. Paraoxonase 2 gene polymorphisms and prenatal phthalates' exposure in Chinese newborns. *Environmental research*, 140, 354-359.
- XIE, C., ZHAO, Y., GAO, L., CHEN, J., CAI, D. & ZHANG, Y. 2015b. Elevated phthalates' exposure in children with constitutional delay of growth and puberty. *Molecular and cellular endocrinology*, 407, 67-73.
- XU, H., DONG, X., ZHANG, Z., YANG, M., WU, X., LIU, H., LAO, Q. & LI, C. 2015. Assessment of immunotoxicity of dibutyl phthalate using live zebrafish embryos. *Fish & shellfish immunology*, 45, 286-292.
- YANG, J., HAUSER, R. & GOLDMAN, R. H. 2013. Taiwan food scandal: The illegal use of phthalates as a clouding agent and their contribution to maternal exposure. *Food and chemical toxicology*, 58, 362-368.
- YUE, Y., LIU, J., LIU, R., SUN, Y., LI, X. & FAN, J. 2014. The binding affinity of phthalate plasticizers-protein revealed by spectroscopic techniques and molecular modeling. *Food and chemical toxicology*, 71, 244-253.
- ZAKI, G. I. 2015. Determination of phthalate esters in Egyptian PET-bottled water investigated under different storage conditions.