

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS
DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET DU GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Agronomiques
Spécialité : Production et Technologie Laitières

Effets d'une exposition continue à un migrant d'emballage alimentaire « *Di (2-ethylhexyl) phthalate* » chez le rat Wistar PROJET D'ETUDE

Présenté par :

BRAHMIA Abir
MAACHI Hanane
ROUABHIA Souhila

Membres de jury :

Présidente : Dr. SAMRAOUI Farah	(M.C.A)	Université de Guelma.
Encadreur : Dr. BOUDALIA Sofiane	(M.A.B)	Université de Guelma.
Examineur : Mr. MEZROUA El yamine	(M.A.A)	Université de Guelma.

Juin 2015

Remerciements

Ce travail de mémoire n'aurait pas pu aboutir sans le concours de nombreuses personnes à qui nous aimerions témoigner ici notre profonde gratitude et toute notre reconnaissance.

Tout d'abord nous tenons à remercier tous les membres du jury, qui nous ont fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail et de l'avoir lu avec beaucoup d'intérêt et de rigueur : Madame SAMRAOUI Farah pour avoir accepté d'en être la présidente. Monsieur MEZROUA El yamine pour avoir accepté d'en être l'examineur

Nous tenons à remercier notre encadreur, monsieur Sofiane BOUDALIA de nous avoir accordé sa confiance et de nous avoir initié au domaine fabuleux de l'alimentation.

Un grand merci pour les enseignants qui ont contribué de manière directe ou indirecte à l'enrichissement de ce travail.

Enfin, merci à tous les membres de nos familles pour leurs soutien indéfectible, leurs encouragement leurs disponibilité et leurs compréhension sans eux ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Résumé

Durant la dernière décennie, la problématique de santé liée aux migrants d'emballages s'est étendue à des nouvelles pathologies autres que les problèmes de la reproduction.

Le présent travail s'organise en :

Une première partie, se résume en une recherche bibliographique portant sur des généralités sur le sujet des migrants d'emballage.

Une deuxième partie, décrit un **projet d'étude** avec le matériel et les méthodes qui seront utilisées dans cette étude, ainsi que le plan des analyses statistiques qui seront retenues pour le traitement des données. Et enfin une courte discussion des résultats attendus.

L'objectif de ce travail était de définir les conséquences d'une exposition **continue au di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)**, à une **dose faible et** définie comme «**non nocive** » par les autorités réglementaires. Une exposition continue au DEHP, fera l'objet d'une étude intégrative chez le rat *Wistar* qui prendra en compte le métabolisme énergétique et le développement.

Notre protocole va nous permettre de déterminer les effets sur :

- Le développement de la masse corporelle, de tissu adipeux.
- L'évolution des paramètres sanguins (HDL, LDL, Glu, leptine, insuline...).

En conclusion, ce protocole expérimental, va nous permettre de chercher des corrélations entre une exposition aux migrants d'emballages et le développement des maladies métaboliques telles que le diabète et l'obésité.

Mots clés : migrant d'emballage, tissu adipeux, obésité, tolérance au glucose, cholestérol.

Abstract

During the last decade, the issue of health-related chemical migrants includes the *di* (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) has been extended to new diseases other than reproductive problems.

This work is organized in two parts:

The first part is summarized in a bibliographic research on generalities on the subject of packaging migrants.

A second part describes a **research project** with the materiel and methods to be used in this study, the statistical analysis plan that will be used for the data processing. Finally we add a brief discussion of expected results.

The objective of this study was to define the effects of lifelong exposure to DEHP, at low doses defined as "non-harmful" by the authorities.

In this aim, the effects of DEHP will be investigated in the *Wistar* rat by using an integrative experimental approach which takes into account metabolic parameters and development.

Our protocol will allow us to determine the effects on:

- Body weight development and adipose tissue differentiation.
- Changes in blood parameters (HDL, LDL, Glu, leptin, insulin ...).

In conclusion, this experimental protocol, will allow us to look for correlations between exposure to chemicals migrants from food packaging and the development of metabolic diseases such as diabetes and obesity.

Keywords: chemicals migrants, DEHP, adipose tissue, obesity, glucose tolerance, cholesterol.

الملخص

خلال العقد الماضي , انتشرت مشكلة صحية مرتبطة بالهجرة بالتعبئة و التغليف ذات نطاق واسع مما أدى إلى ظهور أمراض جديدة و أخرى متعلقة بمشاكل الإنجاب. و كان الهدف من هذا العمل تحديد نتائج العرض المستمر

ل *di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)* عن طريق جرعة ضعيفة محددة (غير مؤذية) من قبل السلطات التنظيمية المعمول بها. العرض المستمر هدفه يتمثل في الدراسة التكاملية للفئران من نوع ويسترن على مستوى الطاقة الأيضية و التطوير.

سوف يسمح لنا البروتوكول بتحديد الآثار المترتبة عن :

- تطوير وزن الجسم و الأنسجة الدهنية

- تغيرات في فحص الدم (حمض الغلوتاميك , الأنسولين , لبتين)

في الختام , هذا البروتوكول التجريبي سوف يسمح لنا بالبحث عن الارتباط المتبادل بين المواد المتنتقلة عن طريق التغليف و تطور الأمراض الأيضية مثل : مرض السكري, السمنة .

كلمات البحث : الهجرة , التعبئة و التغليف , الأنسجة الدهنية , السمنة , طاقة الجلوكوز , الكوليسترول.

Abréviations

ACTH	Adrénocorticotrophine
AGD	<i>Anogenital Distance</i> (Distance ano-génitale)
BBP	Phtalate de benzyle et de butyle
CCK	CholéCystoKinine
CERHR	<i>Center for the evaluation of risks to human reproduction</i>
DBP	Phtalate de dibutyle
DEHP	Phtalate de di-2-éthylhexyle
DEP	Phtalate de diéthyle
DEQM	Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé
DES	Diethylstilbestrol
DIDP	Phtalate de di-isodecyle
DINP	Phtalate de di-isononyle
DJA	Dose Journalière Acceptable
DJT	Dose Journalière Tolérable
DMP	Phtalate de diméthyle
DnBP	Phtalate de di-n-butyle
DnHP	Di-n-hexyl phthalate
DnOP	Phtalate de di-n-octyle
E.B	Œstradiol Benzoate
EFSA	Autorité Européenne de sécurité des aliments
EH	2-éthylhexanol
EHA	acide 2-éthylhexanoïque
ELISA	<i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>
F0	Génération 0
F1	Génération 1
GD	Gestational day
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
IMC	Indice de masse corporelle
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LMG	Limite de migration globale
LMS	Limites de migration spécifique
MEHP	Mono-2 ethylexyl phtalate
NHANES	<i>The National Health and Nutritional Examination survey</i>

NTP	The nationale toxicology program
OVX	Ovariectomie
PC	Poids corporel
PF	Poids frais
PND	Post natal day
PPARα	<i>peroxisome proliferator activated receptor alpha</i>
PS	Poids sec
PVC	Chlorure de PolyVinyle
SEM	Standard error mean
TT	Tour de taille

Liste des figures

Figure :	Titre :	Page :
1	Structure chimique de base des phtalates	05
2	Échanges de matières entre les matériaux et leur environnement	06
3	Composition du régime L5 et du régime	15
4	Protocole d'exposition continue	18
5	Dispositif de mesure de la distance ano-génitale	20
6	Détermination du stade de séparation du prépus chez le rat	22
7	Détermination du stade de l'ouverture vaginale chez la ratte femelle au stade pré-pubertaire (A), apparition de la puberté (B)	22
8	Interprétation des frottis chez la ratte	24
9	Dispositif de mesure de la masse grasse	26
10	Coupe histologique de tissu adipeux péri-gonadique	27

Liste des tableaux

Tableau :	Titre :	Page :
1	Teneurs en phtalates dans les aliments (ng /g PS) et dans les eaux de boissons	8
2	Teneurs en phtalates [$\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids frais (PF)] dans du lait de vache	9

Sommaire

Introduction	1
1. Rôle endocrine de tissu adipeux.....	1
2. Effets des hormones sexuelles sur la prise alimentaire et sur les préférences sensorielles (sucré/salé)	3
3. Définition de phtalates	4
3.1. Données chimiques	4
3.2. Voies d'exposition	7
3.3. Exposition par ingestion.....	7
3.4. Effets d'une exposition aux phtalates	9
4. Les objectifs	12
5. Matériels et méthodes	14
5.1. Matériel biologique et réactifs chimiques	14
5.1.1. Molécule étudiée.....	14
5.1.2. Animaux, produits et matériels spécifiques à l'expérimentation animale	14
5.1.2.1. Animaux et hébergement	14
5.1.2.2. Matériel de mesures	15
5.2. Expérimentations animales	16
5.2.1. Conditions d'élevage et de traitements.....	16
5.2.1.1. Exposition continue au DEHP chez le rat.....	16
5.2.2. Etudes de développement	19
5.2.2.1. Gestation et développement prénatal	19
5.2.2.2. Naissances et caractérisation de la portée	19
5.2.2.3. Croissance et prise alimentaire	19
5.2.2.4. Distance ano-génitale.....	20
5.2.2.5. Apparition de la puberté.....	21
5.2.2.6. Durée des cycles œstrals	23
5.2.3. Sacrifice et prélèvements	25
5.2.3.1. Recueil de données avant le sacrifice	25
5.2.3.2. Modalités des sacrifices et prélèvements sanguins	26
5.2.3.3. Prélèvements d'organes et conditions de stockages	26
5.2.4. Analyse Histologique Et Biochimique Des Organes	27
5.2.4.1. Etude du tissu adipeux	27
5.2.4.1.1. Analyse histologique (coloration à l'Hemalun/Eosine)	27
5.2.5. Dosage biochimiques.....	28
5.2.5.1. Dosage de leptine	28
5.2.5.2. Dosage des marqueurs métaboliques	28
5.3. Analyses statistiques des données	28
6. Résultats attendus.....	30
Références bibliographiques	32

Introduction

L'indice de masse corporelle (IMC) de la population ne cesse d'augmenter, conduisant un nombre croissant d'individus vers une obésité majeure. Celle-ci est l'origine d'un déséquilibre énergétique qui est normalement régulé par le comportement alimentaire, lequel est contrôlé par le système nerveux central, en particulier par des régions thalamiques et hypothalamiques où se situent de zones régulatrices de la prise alimentaire (noyau arqué). L'étude de ces régulations a permis de découvrir une cytokine, la leptine, une protéine de 167 acides aminés, est principalement synthétisée par le tissu adipeux. Elle joue un rôle-clé dans le contrôle de la réserve adipeuse et de la prise alimentaire, mais est aussi impliquée dans les préférences gustatives et dans le contrôle de la satiété ([Kawai et al 2000](#)).

Les hormones sexuelles sont étroitement associées à l'obésité : un dysfonctionnement de système endocrinien peut altérer plusieurs fonctions autres que la reproduction, comme l'utilisation et le stockage de l'énergie, la répartition des graisses, les perceptions sensorielles et la prise alimentaire, conduisant à des modifications de comportement sexuel et alimentaire.

Certains xéno-biotiques possèdent des effets stéroïdiens : on y trouve des pesticides (vinclozoline), des migrants d'emballages alimentaires (bisphénol A, **phtalates (DEHP)**), des polluants atmosphériques (dioxine), des médicaments (Diéthylsylvestrol ou DES), mais aussi des molécules naturelles (phyto-œstrogènes : génistéine). Une exposition à ces molécules est susceptible de produire une perturbation de système endocrinien des mammifères y compris chez l'espèce humaine.

Les migrants d'emballage vont mimer ou interférer avec l'action des hormones endogènes, notamment celles de la reproduction (ce sont des ligands des récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes) : ils peuvent nuire à la fertilité ou perturber le développement fœtal et pubertaire, mais aussi agir sur de nombreux tissus hormono-régulés dont le cerveau et le tissu adipeux. Ainsi, des expositions prénatales en DES ou en xéno-œstrogènes entraînent un développement de la masse adipeuse à l'âge adulte, ce qui conduit plusieurs auteurs à suggérer que les xéno-hormones soient impliquées dans le développement de l'obésité ([Newbold et al 2007](#)). Plusieurs données de la littérature soutiennent cette hypothèse, et la leptine pourrait être une des cibles moléculaires initialement affectée.

Les emballages sont des moyens indispensables de protection, de conservation, de transport, d'information, d'usage des aliments, les emballages sont omniprésents dans la vie

du consommateur. Dans ce secteur des conditionnements alimentaires, le plastique a conquis une place prépondérante. Or il existe des interactions, et donc des problèmes de compatibilité, entre les emballages plastiques et les aliments, dus notamment à la migration de composants du plastique vers l'aliment.

Les monomères des matériaux de base ou les additifs incorporés au plastique peuvent se transférer dans l'aliment, avec des conséquences sur les plans organoleptique ou toxicologique. Ce phénomène de migration dépend de la composition de l'emballage (nature, volatilité, concentration des molécules) mais également de celle de l'aliment, puisque la migration est fonction des affinités entre le migrant et le produit emballé. La plupart des monomères et des adjuvants étant lipophiles, la migration est généralement plus importante dans un milieu gras que dans un milieu aqueux.

Aussi certains constituants de l'aliment, susceptibles de passer dans l'emballage et d'en modifier la structure, peuvent aussi activer la migration de composés du plastique. L'emballage peut enfin être perméable à des contaminations provenant de l'environnement (encre utilisée sur sa face externe, odeurs du lieu de stockage...), qui peuvent également altérer l'aliment. En règle générale, la migration augmente avec la durée et la température de stockage.

Depuis une vingtaine d'années, des recherches sont menées afin d'évaluer l'innocuité de ces produits pour la santé humaine. En effet, ils contiennent de nombreuses molécules issues de la chimie n'existant pas dans le monde vivant : les xénobiotiques. Dans cette catégorie entrent notamment *les phtalates (ex DEHP)*. Certaines de ces molécules peuvent potentiellement affectées le bon fonctionnement de l'organisme (homéostasie général).

Ce mémoire fait la synthèse dans un premier temps des connaissances de l'action des hormones sexuelles sur le tissu adipeux et les connexions possibles avec le comportement et la prise alimentaire, dans un second temps il présente les effets connus des migrants d'emballage sur les paramètres impliqués dans les processus d'obésité, et enfin présente le programme d'étude envisagé.

Une deuxième partie, décrit un **projet d'étude** avec le matériel et les méthodes qui seront utilisées dans cette étude, ainsi que le plan des analyses statistiques qui seront retenues pour le traitement des données. Et enfin une courte discussion des résultats attendus.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1. Rôle endocrine de tissu adipeux

a- Endocrinologie de tissu adipeux : Le tissu adipeux constitue la plus grande réserve d'énergie de l'organisme. La mobilisation de cette énergie est contrôlée par des signaux hormonaux provenant de divers organes comme le pancréas (insuline), les surrénales (glucocorticoïdes) et les gonades (stéroïdes). C'est aussi un véritable organe endocrine très actif et les substances secrétées par les adipocytes ont d'importantes fonctions physiologiques : l'angitensinogène et l'angiotensine II et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1(PAI-1), impliqués dans la régulation de l'hypertension, et plusieurs adipokines impliquées dans la régulation du comportement alimentaire: l'adiponéctine, la résistine, la leptine et les acides gras (AG) ([Gaillard 2003](#)).

b- Les triglycérides : Dans le tissu adipeux, le Glycérol-3-P, apporte le Glycérol qui réagit avec 2 acyl gras COA pour former l'acide phosphatidique. Le groupe phosphate est clivé pour former un diacylglycérol, qui réagit avec un autre Acyl gras COA pour former un Triacylglycérol. Ces réactions sont à la base du processus de mise en réserve adipeuse qui se traduit par un stockage des triglycérides (TG). Ce processus est contrôlé par les hormones stéroïdiennes (obésité androïde/genoïde), et la lipogenèse est stimulé principalement par l'insuline. A l'inverse, leur libération est concomitante de la baisse d'insuline et d'une élévation des catécholamines. La lipolyse est également activée par le glucagon et toutes les hormones dites adipocinétiques (produites au cours du stress, de l'effort ou du jeûne).

c- La leptine : En 1994 et après clonage et expression de gène *ob* par l'équipe de Friedman, c'est la découverte de la leptine produite essentiellement par les adipocytes. Sa concentration plasmatique est directement proportionnelle aux quantités des cellules graisseuses de l'organisme. Elle baisse la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique. Elle agit en se fixant sur des récepteurs appartenant à la classe I des cytokines et qui sont surtout exprimés au niveau de système nerveux central, en particulier au niveau du centre de satiété de l'hypothalamus, mais aussi au niveau d'organes périphériques comme le tissu adipeux, les cellules pancréatiques β , et le foie, d'où le rôle autocrine et paracrine de la leptine dans la régulation énergétique ([Gaillard 2003](#)).

- Effets sur la prise alimentaire: Quand la prise et la dépense d'énergie sont égales, le niveau de la leptine plasmatique reflète la masse grasse du corps, alors que quand il y a un déséquilibre, la leptine inhibe la biosynthèse et la sécrétion de l'insuline, la gluconéogenèse, inverse l'insulino-résistance et diminue le niveau des lipides intra cellulaire en activant la β -oxydation des AG au niveau mitochondrial. Une surexpression de leptine entraine normalement une diminution de

la prise alimentaire et, par voie de conséquence, le poids corporel associée à une disparition de tissu adipeux. Chez des sujets obèses qui présentent une déficience à la leptine, un traitement avec la leptine réduit l'hyperphagie et augmente la perte du poids, car au niveau central la leptine stimule aussi la suppression d'appétit ([Kawai et al 2000](#)).

- Effets sur les préférences au sucré : Plusieurs auteurs montrent que la leptine joue un rôle important dans la perception des saveurs sucrées. Les travaux de Shimizu et al. ont montré une action au niveau du cerveau : ils ont pratiqué des lésions au niveau de l'hypothalamus ventromédiane (VMH) chez des rats obèses pour observer la réponse des voies sensitives (chorda tympani IIV) déclenché par une substance sucrée, et tenter de relier ce phénomène à l'obésité. Ils ont montré que peu après les lésions, il n'y a pas de différence significative dans les réponses neuronales au sucré, mais au bout d'une période plus longue, ces lésions induisent une amplification des réponses au sucré (à l'exception du fructose). Par contre, chez des souris génétiquement diabétiques *db/db*, ils ont observé des amplifications des réponses de nerf IIV pour le goût sucré. Cet effet résulte de l'absence d'effet inhibiteur de la leptine dans les récepteurs situés au niveau des cellules des bourgeons du goût (suite à l'absence d'insuline) ([Shimizu et al 2003](#)).

D'autres études montrent que la sensibilité au goût sucré peut résulter d'un défaut au niveau des récepteurs de leptine qui affichent une amélioration des réponses neuronales. L'administration de la leptine à des souris maigres supprime les réponses des nerfs périphériques du goût aux substances sucrées sans affecter les réponses au aigre, salé et amer. L'ensemble de ses observations suggère que l'organe du goût soit une cible périphérique de leptine qui module localement la perception au sucré ([Kawai et al 2000](#)).

d- Régulation hormonale de la synthèse de leptine : D'après Kristensen et al., la sécrétion de leptine par le tissu adipeux est augmentée de 32% à 48% chez les rats males suite à une stimulation par le 17 β -œstradiol, et de 75% chez les femelles avec une même stimulation. L'utilisation des femelles OVX (ovariectomie) a montré que les œstrogènes ont un rôle de facteur trophique sur la sécrétion de leptine, et aucune hormone androgénique n'influence la sécrétion de leptine d'une façon directe chez le rat ([Kristensen et al 1999](#)).

Après cette date d'autres études vont à l'encontre de ses résultats : Kus et al., a pratiqué une étude immuno-histochimique, dont laquelle il a montré qu'une augmentation de sécrétion de leptine chez des rats males, avec une orchidectomie (ablation des testicules), sera corrigée par une injection de testostérone au niveau de l'hypophyse antérieure. L'axe Hypothalamo-Hypophyso-

CorticoSurrénalien (HPS) module également la synthèse de leptine, qui à son tour exerce un effet inhibiteur sur l'activité des glandes surrénales ([Kus et al 2007](#)).

Les glucocorticoïdes stimulent l'expression et la production de la leptine par les adipocytes, alors que le taux élevé de l'ACTH les inhibent ([Gaillard 2003](#)). De plus, le métabolisme et le transport du glucose sont d'importants facteurs dans la régulation de la synthèse de leptine : l'insuline augmente l'utilisation du glucose par les adipocytes et est probablement lié à la stimulation de la sécrétion de leptine.

2. Effets des hormones sexuelles sur la prise alimentaire et sur les préférences sensorielles (sucré/salé)

Selon Geary, les œstrogènes contrôlent la prise alimentaire et les mécanismes de satiété, en agissant sur la cholécystokinine (CCK), laquelle diminue la prise alimentaire. A l'inverse, les androgènes favoriseraient la prise alimentaire seulement chez le mâle, ils agiraient sur la balance énergétique, mais les mécanismes ne sont pas bien décrits ([Geary 2001](#)).

a- Effet de l'âge : Les goûts et les préférences alimentaires varient en fonction de l'âge et du statut hormonal propre à chaque stade de développement : enfance, puberté, grossesse, ménopause, vieillissement, suggérant que les hormones sexuelles interviennent aussi sur les préférences sensorielles. Les œstrogènes agissent sur les préférences sensorielles car les préférences aux saveurs sucrées varient au cours du cycle menstruel. Cet effet est démontré à partir d'hormones de synthèse : chez des rats adultes OVX (ovariectomie), un traitement à l'E.B (Estradiol Benzoate) induit une aversion conditionnée pour le sucrose aux faibles et fortes doses, montrant que les œstrogènes interviennent dans la capacité de distinguer des niveaux de dilution en sucrose ([Curtis et al 2005](#)).

Par contre, une exposition périnatale en *éthynil œstradiol* entraîne une diminution de la prise alimentaire au sevrage, mais les modifications des préférences sensorielles sont observées seulement à l'âge adulte et concernent le salé ([Ferguson et al 2003](#)). Les effets des androgènes ne sont pas clairement décrits mais ils agiraient sur la prise de sucré.

b- Effet du sexe: Curtis et al., montrent que la prise alimentaire varie selon le sexe. Afin d'évaluer le rôle des œstrogènes et des androgènes, il réalise des tests de préférences et de sensibilité gustatives et enregistre les réponses à la perception du goût chez des rats mâles et chez des femelles adultes OVX (modèle animal limitant les fluctuations en œstrogène liées aux cycles ovariens). Il observe que les femelles sont moins sensibles aux basses concentrations de sucrose et en déduit que

les œstrogènes ne jouent pas un rôle majeur dans les réponses gustatives au sucré. Par contre, il constate clairement une plus grande préférence au salé que chez les mâles, confirmant l'implication des hormones sexuelles dans les réponses gustatives ([Curtis et al 2004](#)).

3. Définition de phtalates

Les phtalates sont des liquides visqueux, transparents, souples, flexibles, incolores, avec peu ou sans odeur et très peu volatiles. Ils sont très peu solubles dans l'eau, c'est pourquoi ils auront une affinité particulière pour les graisses et alcools lourds. La production mondiale de phtalates est de 4,3 millions de tonnes en 2006 ([Peijnenburg & Struijs 2006](#)) contre 1,8 millions de tonnes en 1975, sont présents partout à des niveaux différents dans notre environnement quotidien. Ainsi, on les retrouve dans pratiquement tous les articles en PVC de manipulation quasi-quotidienne, emballage de produits notamment alimentaires, et produits de santé.

Le nom phtalate dérive du terme = *acide phtalique* = lui-même dérivant du mot (naphthalique). Les phtalates ressemblaient à l'huile végétale pure, ont peu ou pas d'odeur et confèrent des caractéristiques appréciables aux différents produits de consommation.

Concernant leur toxicité, les phtalates sont des perturbateurs endocriniens avérés chez les animaux tels que les rongeurs ([Harris et al 1997](#)) et également, chez l'Homme. Chez ce dernier, les principales préoccupations portent sur la fertilité et sur le développement post-natal ([Kavlock et al 2002](#)) mais également le métabolisme énergétique et l'obésité ([Wang et al 2013](#)).

Chez l'Homme, l'exposition est souvent difficile à évaluer, en raison de la multiplicité des sources potentielles et des situations. Elle peut en effet, se produire par inhalation, contact ou ingestion.

3.1. Données chimiques

Les phtalates (figure 1) sont des substances qui font partie d'une famille de produits chimiques constitués d'un noyau benzénique et de deux groupements carboxylates générant une structure de type diester appelés « ester phtaliques » qui sont le produit d'estérification ou une réaction d'un acide phtalique avec un ou plusieurs alcools leurs formules générale est présentée ci-dessous ([Andrade et al 2006](#)).

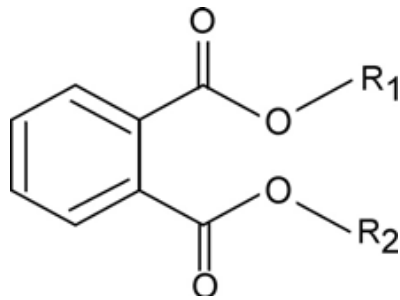


Figure 1 : structure chimique de base des phtalates

Les phtalates sont des liquides organiques visqueux, transparent qui n'émettent dans l'atmosphère que très peu de vapeurs dans les conditions usuelles (très faible tensions de vapeur).les phtalates sont très peu solubles dans l'eau, et ont une forte affinité pour les graisses ou les alcools lourds ([Hao et al 2012](#)).

Les phtalates les plus utilisés sont :

- *Le DEHP (Di(2-éthylhexyl) phtalate)*
- *Le BBP (Butyl-benzyl-phtalate),*
- *Le DBP (Di-butyl-phtalate),*
- *Le DEP (diéthyl-phtalate),*
- *Le DINP (Di-isononyl-phtalate).*

Aujourd'hui les Phtalates sont produits à quelque 3 millions de tonnes par an dans le monde, ils sont présents partout, à des niveaux différents, dans notre environnement quotidien. Les phtalates sont présents dans les produits alimentaires (produits laitiers), et parmi ces phtalates, il y'a le DEHP :

C'est le phtalate le plus utilisé, il peut être libéré dans l'environnement à tous les stades de son cycle de vie : dans la production, la transformation, l'utilisation, l'incinération ou la mise en décharge. La majeure partie du DEHP qui se retrouve dans l'environnement provient de l'utilisation et de l'élimination des produits en PVC flexible. Le DEHP n'est pas chimiquement lié aux produits polymères auxquels il est ajouté.

Le DEHP se décompose lentement dans l'eau, mais il peut rester longtemps dans le sol et les sédiments. Il s'accumule dans les organismes vivant dans les sédiments et le sol.

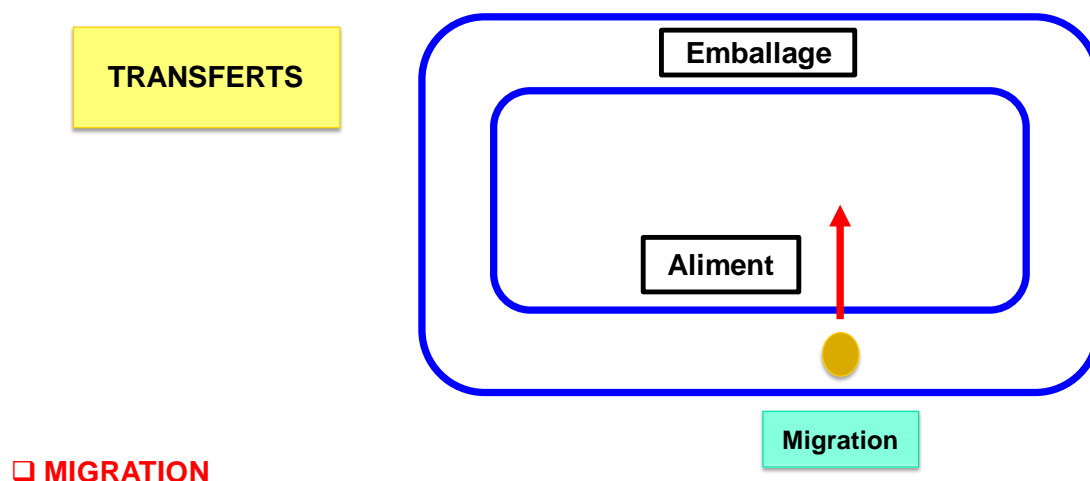
Les concentrations de DEHP sont particulièrement élevées dans les eaux usées, les eaux de surface, le sol et les sédiments avoisinants les sites industriels où le DEHP est produit ou transformé tels que les produits laitiers (lait, fromage, beurre...).

➤ **Migration des phtalates**

C'est le passage dans des denrées alimentaires (lait et produits laitiers par exemple) de composants provenant de l'emballage. Pour pouvoir assurer la sécurité des produits, il est important de contrôler la migration des matériaux utilisés pour l'emballage (figure 2).

Du saladier à la bouilloire et aux biberons, en passant par les boîtes de conserve, les canettes de soda et la poêle à frire, nous utilisons chaque jour une multitude d'objets en plastique, ou enduits de plastique. Les composés chimiques qu'ils renferment sont-ils vraiment inoffensifs ?

Les phtalates une fois polymérisées, ces molécules sont censées rester à l'intérieur du matériau. Sauf que, sous l'action de la chaleur par exemple, elles migrent dans les aliments. Même si des seuils de migration sont fixés par la réglementation européenne et respectés par les industriels, on peut se demander si la multi-exposition à ces molécules ne nous met pas en danger. D'autant que le débat scientifique sur leurs effets délétères fait rage et que le législateur serait sur le point de faire évoluer sa position.



*Figure 2 : Échanges de matières entre les matériaux et leur environnement
[D'après (Endrizzi et al 2009)]*

D'un point de vue réglementaire, la réglementation définit deux types de limites de migration :

Une limite de migration globale (LMG) qui fixe la somme totale des substances, indépendamment de leur nature, à un maximum de 10 mg/dm² pour les matériaux en contact avec les aliments, ou 60 mg/kg pour les aliments ou simulants alimentaires mis en contact avec les matériaux ;

Des limites de migration spécifique (LMS) qui peuvent être beaucoup plus faibles et s'appliquent aux produits chimiques individuels. Elles sont basées sur une évaluation toxicologique des substances concernées.

3.2. Voies d'exposition

L'exposition des personnes peut se faire par la présence de DEHP dans l'environnement ou dans les produits de consommation ([Hao et al 2012](#)).

Les expositions les plus élevées peuvent se produire sur les lieux de travail où l'on produit ou utilise du DEHP ou des produits contenant du DEHP. Les travailleurs y sont exposés par l'air qu'ils respirent ou par le contact avec la peau.

L'exposition du grand public peut provenir de plusieurs sources, comme l'air à l'intérieur des habitations. On trouve du DEHP dans le lait maternel et les préparations pour les biberons, ainsi que dans des aliments cultivés près de sites de production utilisant du DEHP. Les niveaux d'exposition les plus élevés sont enregistrés lors de procédures médicales telles que les transfusions chez les nouveau-nés ou l'hémodialyse à long terme chez les adultes.

3.3. Exposition par ingestion

La contamination humaine aux phtalates par ingestion est le mode de contamination le plus important dans la toxicité humaine. En raison de leur solubilité dans les corps gras et leur pouvoir lipophile important, les phtalates ont tendance à se concentrer dans les aliments les plus gras tels que le beurre, le lait ou les fromages, mais également dans la viande.

L'ingestion d'aliments susceptibles d'avoir absorbés des phtalates à partir des matériaux de conservation et d'emballage serait la principale source d'exposition humaine, en particulier dans les pays où les phtalates sont encore admis dans ces matériaux. Pour le BBP,

l'ingestion est estimée à 2 µg/kg/jour et serait 3 fois plus élevée pour les enfants ([Moore 2000](#)).

Cependant, ces valeurs sont 33 à 100 fois plus faibles que la dose journalière tolérable (DJT) qui est fixée à 200 µg/kg/jour. D'après une étude allemande réalisée sur des étudiants sur une période allant de 1988 à 2003, les doses journalières (DJ) moyennes pour le DnBP, le BBP et le DEHP étaient respectivement de 4,1 µg/kg/jour (entre 0,22 – 116 µg/kg/jour), 0,26 µg/kg/jour (entre 0,01 – 27,3 µg/kg/jour) et 3,5 µg/kg/jour (entre 0,19 – 39,8 µg/kg/jour).

Dans cette étude, les auteurs estiment que 14 % des étudiants concernés dépasseraient les doses de référence pour les DJT, fixées à 10 µg/kg/jour pour le DnBP par l'EFSA. De plus, il apparaît dans cette étude un déclin prononcé dans les DJT pour le DnBP et le DEHP entre 1988 et 2003. Ceci est dû aux dernières directives européennes proscrivant l'utilisation de certains phtalates en tant que plastifiant ([EFSA 2005](#)).

A la vue des concentrations et des teneurs relevées dans la littérature, nous constatons une contamination non négligeable des aliments et des eaux d'alimentation par les phtalates. En effet, des concentrations en DEHP allant jusqu'à 24 000 ng/g de PS ont été relevées dans de l'huile d'olive. Cependant, tous les aliments ne sont pas contaminés dans les mêmes proportions. En effet, les aliments possédant des concentrations en matières grasses et en lipides importantes posséderont des concentrations et des teneurs plus significatives en phtalates. En effet, les concentrations les plus élevées ont été retrouvées dans l'huile d'olive, les fromages (vache et brebis), le jambon et les viandes (tableaux 1 et 2).

Enfin, le DEHP semble être le phtalate le plus présent dans les aliments, devant le DnBP et le BBP. Les deux autres phtalates analysés, le DMP et le DEP, semblent être présents à l'état de trace dans les échantillons analysés (tableaux 1 et 2).

Tableau 1 : Teneurs en phtalates dans les fromages (ng /g PS)

Echantillon	DMP	DEP	DnBP	BBP	DEHP
Fromage de brebis			780	25	890
Fromage de vache		Nd - 7	Nd – 300	Nd – 39	41- 1230

Tableau 2 : Teneurs en phtalates [$\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids frais (PF)] dans du lait de vache

Echantillon	(Del Carlo et al 2008)	(Carrillo et al 2008)
DMP		0,40 - 0,61
DEP		0,73 - 4,22
DnBP	< 29 - 244	0,3 - 5,37
BBP	< 29 - 252	
DEHP	< 24 - 276	2,62 - 7,40

3.4. Effets d'une exposition aux phtalates

❖ Effets sur la reproduction

Le niveau de toxicité des phtalates varie selon le type de composé. Le DEHP possède un potentiel de toxicité plus élevé que les autres phtalates incluant le DBP. Les principaux effets des phtalates qui ont été rapportés dans les études expérimentales réalisées auprès de différentes espèces animales 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).

L'exposition au DEHP et au DINP a été associée à une augmentation de l'incidence d'adénome et de carcinome hépatocellulaire chez les rongeurs. Un des mécanismes proposés pour expliquer ce phénomène observé chez ces animaux est une prolifération des peroxysomes et des organelles cellulaires, lequel processus ne serait pas activé chez les primates et les humains.

Chez l'Homme, les effets sur la reproduction, notamment les problèmes de fertilité, et le développement des nouveau-nés sont au centre des principales préoccupations en lien avec l'exposition aux phtalates. Aux Etats-Unis, le *Department of Health and Human Services* a mis sur pied un centre d'évaluation des risques sur la reproduction humaine (*The National Toxicology Program (NTP) Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR)*). Un certain nombre de phtalates ont jusqu'à maintenant fait l'objet d'une évaluation par un panel d'experts afin de déterminer la toxicité de ces composés sur la reproduction et le développement.

À l'exception du DEHP, DINP et à un degré moindre du DBP, les experts ont conclu à des effets sinon nuls à négligeables sur la reproduction et le développement pour la plupart des phtalates étudiés (DnOP, BBP, DIDP, DnHP).

Néanmoins, l'usage de divers équipements médicaux suscite beaucoup d'inquiétude quant aux effets possible du DEHP sur le développement des enfants mâles nés prématurément qui requièrent des soins prolongés. L'US-FDA ainsi que la Communauté européenne sont également préoccupés par l'utilisation des équipements médicaux contenant du DEHP et le risque d'atteinte hépatique chez les jeunes bébés.

❖ Les effets sur le métabolisme énergétique

Largement étudiés chez l'animal, les phtalates sont des produits stables et d'une grande liposolubilité. Bien absorbés par voie orale et par voie pulmonaire, l'absorption cutanée est quasiment inexistante. Dans l'organisme, la distribution est rapide vers les poumons, la rate, les tissus adipeux et plus particulièrement vers le foie. Il n'y a pas d'accumulation de la molécule dans l'organisme du fait de sa demi-vie d'élimination courte et variable selon les espèces animales.

Sa pharmacocinétique se présente sous la forme d'un modèle bi-compartimental avec une deuxième phase d'élimination assez longue qui s'explique par l'existence d'un cycle **entéro-hépatique**. Les études chez l'animal montrent que le DEHP subit une hydrolyse enzymatique en mono (ethylhexyl) phtalate (MEHP), son métabolite principal, avec libération d'un alcool primaire le 2-ethylhexanol (2-EH), qui s'oxyde secondairement en acide 2-ethylhexanoïque (2-EHA). L'activité hydrolytique est assurée par des enzymes pancréatiques (lipases) et plasmatiques (estérases). Le 2-EHA est aussi un métabolite actif toxique.

Dans une étude, qui a portée sur un échantillon représentatif de 2884 enfants et adolescents américains ayant participé à l'enquête NHANES 2003-2008, les auteurs ont montrés une association entre la race/ethnicité, les concentrations urinaires en **phtalates** et l'obésité infantile. Des biomarqueurs de phtalates urinaires étaient associés à une augmentation de masse corporelle chez les enfants noirs non-hispaniques dans cet échantillon national ([Trasande et al 2013](#)).

Dans une deuxième étude où les auteurs ont examiné l'association entre l'exposition aux phtalates, l'indice de masse corporelle (IMC) et le tour de taille (TT) chez des enfants chinois. Les concentrations urinaires en phtalates étaient associées avec l'IMC et le TT chez les enfants sélectionnés (124 de poids normal, 53 en surpoids, et 82 obèses), notamment pour le MEHP (métabolite du DEHP) et le MEP (métabolite du DEP). Des données supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces associations ([Wang et al 2013](#)).

D'un point de vue mécanistique, de nombreux résultats semblent indiquer que les récepteurs nucléaires *PPAR* (*peroxysome proliferator activated receptor*) sont des cibles privilégiées des phtalates (DEHP) chez les mammifères. Un certain nombre de pistes et notamment les gènes induits après une exposition à certains phtalates (DEHP), sont cohérents avec un effet possible via les *PPAR*.

4. Les objectifs

Le DEHP est donc un migrant d'emballage qui se distingue par son affinité pour les récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes. Plusieurs études illustrent des effets du DEHP sur le développement de la masse grasse et le métabolisme énergétique ([Lee et al 2015](#)) ([Hao et al 2013](#)).

Dans ce contexte, il était légitime de retenir cette molécule pour explorer les des effets du DEHP, sur un modèle expérimental, sur différents paramètres déjà connus être sensibles à de faibles doses de migrants d'emballage.

L'objectif principal de ce protocole est donc d'identifier les effets d'une exposition **continue** (de la conception à l'âge adulte) à des **migrant d'emballage** (qui est a la fois œstrogénique, anti- œstrogénique et anti-androgénique) à une **faible dose** sur **deux générations** (F0 et F1) sur le métabolisme énergétique et le développement et de prendre en considération des cibles périphériques (tissu adipeux) ou des paramètres développementaux (puberté, distance ano-génitale) ou des paramètres métaboliques (dosages sériques).

Le choix de ce type d'exposition (de la conception à l'âge adulte, à une faible dose), et le choix de la dose permettra de se rapprocher le plus de ce qui se passe dans notre environnement.

L'objectif à terme est de pouvoir relier les effets de ce type d'exposition à des problèmes de santé publique telle que l'obésité, les troubles métaboliques et des troubles du comportement.

PROJET D'ETUDE

5. Matériels et méthodes

5.1. Matériel biologique et réactifs chimiques

5.1.1. Molécule étudiée

Le DEHP de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) et sa pureté est $\geq 99\%$. Tous les produits sont conformes aux normes exigées par la DEQM (Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé) (<http://www.edqm.eu/en/Homepage-628.html>).

5.1.2. Animaux, produits et matériels spécifiques à l'expérimentation animale

5.1.2.1. Animaux et hébergement

Origine : Les rats qui seront utilisés sont des rats Wistar Han. Ils seront reçus à l'âge de 6 semaines et seront hébergés à l'animalerie de l'université de Guelma, en conditions contrôlées (22°C, 55% d'humidité relative, cycles jour/nuit de 12h/12h).

Nature des cages et biberons : Toute utilisation de plastiques et consommables en polycarbonate sera écartée pour éviter des contaminations en bisphénol A ou phtalates. Les animaux seront hébergés en cages de polypropylène (4 animaux/cage) et les biberons seront en verre ou en polypropylène.

Régimes : A leur arrivée, les animaux seront alimentés avec un régime *low phyto-estrogènes* 2018 (Harland Teklad, figure 3), c'est-à-dire avec le même régime qu'ils reçoivent depuis le sevrage chez le fournisseur. Ce régime a une teneur réduite en phyto œstrogènes (250 mg/kg) par rapport à un régime standard, donc il contient moins d'isoflavones (dont la génistéine). Bien qu'il soit préconisé pour l'étude des migrants d'emballage, il n'est pas totalement dépourvu de phyto-estrogènes. Avant toute expérimentation, les animaux seront donc adaptés pendant 15 jours à un régime de croquettes semi-synthétique, "le régime L5" (INRA, Jouy-en-Josas, France) (Figure 3)] pendant les 11 semaines. Ce régime permet de s'affranchir de la présence de phyto-œstrogènes. Les régimes seront donnés *ad libitum* et les cages sont réapprovisionnées tous les deux jours.

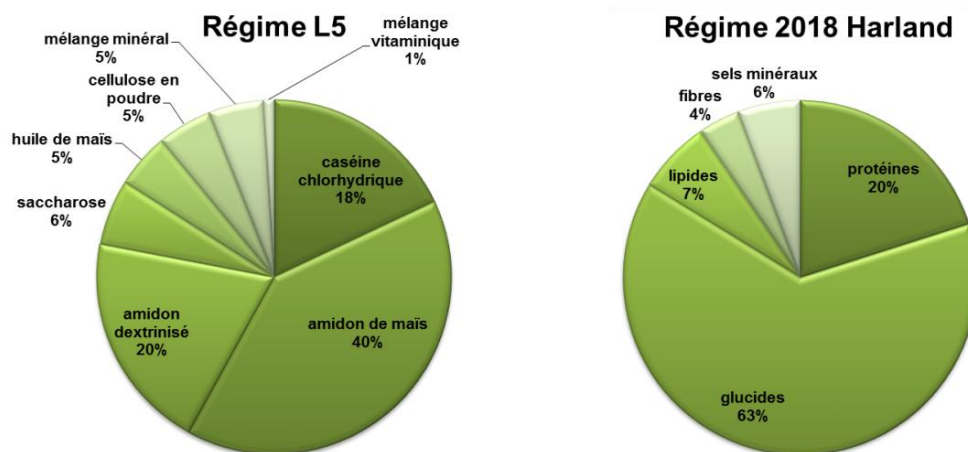


Figure 3 : Composition du régime L5 et du régime Harland 2018

Eau de boisson : L'eau de boisson qui sera utilisée est de l'eau de ville filtrée sur charbon actif pour éliminer toute trace de contaminant (pesticides, détergents) pouvant avoir des effets endocriniens.

Les litières : Les litières seront composées de sciures de peuplier, qui ne dégageront pas de poly-phénols ni de terpènes susceptibles d'agir aussi comme phyto-estrogènes. La litière sera auto-clavée à 134°C pendant 10 min, elle sera changée une fois par semaine.

5.1.2.2. Matériel de mesures

Les régimes et les animaux seront pesés avec une balance électronique couplée à un système informatique qui permettra une acquisition directe des données sur des fichiers EXCEL. Ce dispositif permettra d'éviter des erreurs lors de la prise de données et assurera une traçabilité.

Réactifs pour analyses d'histologie

Les réactifs Shandon Rapid-Fixx™ (réf : 230014), Shandon Cryomatrix™ (réf : 230125) de chez Thermo Scientific (Courtaboeuf, France). L'Hémalun de Mayer (réf : 1.09242.0500) de chez Merck Chimie (Fontenay-sous-Bois, France). Le Fuchsine-Ponceau (réf : C0443), phosphomolybdique (réf : G0012) et le Vert Lumière (réf : CO702) de chez Diapath (Francheville, France). L'isopentane de chez Carlo Erba (Val de Reuil, France). L'Optimal Cutting Temperature OCTTM (réf : 004511241), le Safesolv (réf : 00699464), le Safemount (sans xylène) (réf : 00647520), et le formaldéhyde 40% de chez Labonord (Templemars, France).

Réactifs de biochimie

Tous les produits chimiques qui seront utilisés pour les analyses immunologiques seront livrés par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) et seront de la meilleure pureté.

5.2. Expérimentations animales

Toutes nos expérimentations animales seront soumises à l'approbation du comité d'éthique de l'Université de Guelma. Les animaux seront traités avec soins et respect. Tout animal souffrira sera euthanasié avec du gaz carbonique, à basse concentration (jusqu'à 10%) dans une enceinte à CO₂.

5.2.1. Conditions d'élevage et de traitements

5.2.1.1. Exposition continue au DEHP chez le rat

Cette étude sera basée sur un modèle d'exposition continue à des migrants d'emballage précédemment établi pour réaliser des études sur la fertilité, le développement et le comportement et donc compatible avec des études sur le métabolisme énergétique.

Un total de 20 femelles et 20 mâles âgés de 14 semaines seront mis en couple en appariant un mâle pour une femelle. L'accouplement sera contrôlé tous les matins : il sera validé par la présence d'un bouchon vaginal ou de spermatozoïdes dans un prélèvement qui sera effectué par lavage vaginal avec 50 µL de sérum physiologique. Les femelles positives seront immédiatement isolées et réparties en 2 lots (10 femelles/lot). A partir de ce jour (*Gestational Day 0*), elles recevront quotidiennement la molécule d'intérêt (DEHP) jusqu'au sevrage.

Seules les femelles prises dans les 3-4 premiers jours de la mise en couple seront retenues pour l'étude de manière à constituer des lots homogènes (Figure 4). Le composé (DEHP) sera mis en solution dans l'huile de maïs (0,4 mL/kg PC/j) et déposé dans la bouche à l'aide d'une micropipette.

Parmi ces deux lots, un lot sera exposé au Phtalates. Le lot témoin sera gavé avec l'huile seule (témoin négatif).

A la mise bas, les portées seront pesées, sexées et alignées en 10 animaux par portées : 5 mâles et 5 femelles dans la mesure du possible. Le cas échéant, des adoptions croisées le jour de la naissance seront réalisées au sein d'un même lot.

Au sevrage, les mères seront sacrifiées et les jeunes rats seront identifiés par une puce électronique introduite sous la peau au niveau dorsal ou une bague avec un numéro d'identification. Les rats sevrés seront exposés *per os* jusqu'à l'âge adulte avec le même produit

[12 rats/sexe/groupe (1 mâle et une femelle par portée pour chaque groupe)], ils seront sacrifiés vers à l'âge adulte.

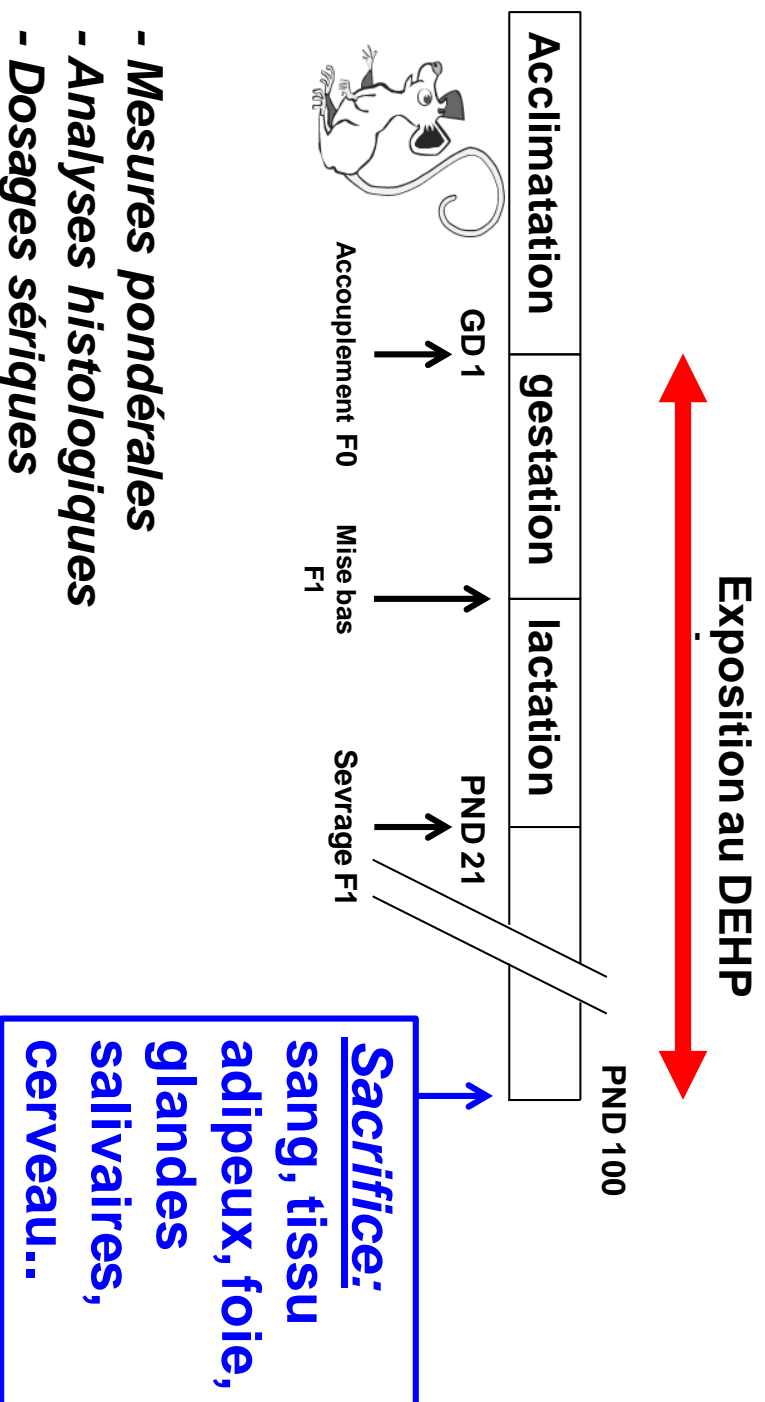


Figure 4 : Protocole d'exposition continue (conception-âge adulte) de rats au phthalates. GD : (gestational day), PND : (post natal day)

A l'âge adulte, le gavage sera arrêté à PND 100 pour les deux lots.

5.2.2. Etudes de développement

5.2.2.1. Gestation et développement prénatal

Les mères seront observées quotidiennement pour déceler toute trace de comportement anormal ou tout signe de toxicité dès le début de la gestation jusqu'au sevrage : des pesées bihebdomadaires de la nourriture et de l'eau consommée et des pesées hebdomadaires des animaux permettent de s'assurer de l'état de santé. Une modification brutale de la courbe de poids au cours des deux derniers tiers de la gestation sera considérée comme symptomatique d'un avortement spontané. Pour chaque femelle, le moment de la mise bas dans la journée (matin ou après-midi) sera noté pour calculer précisément la durée de la gestation, tout avortement sera enregistré.

Au sevrage, les mères seront sacrifiées et l'examen de l'utérus permettra de compter les boutons embryonnaires (ensemble de cellules qui est l'origine de tous les tissus de fœtus). Le nombre de boutons embryonnaire - le nombre total des ratons nés (vivants et morts) permettra de compter les pertes post-implantatoires.

5.2.2.2. Naissances et caractérisation de la portée

A la naissance, la portée sera caractérisée par le nombre d'animaux et le poids global tout animaux confondus, puis les animaux seront pesés et sexés.

Le sexe ratio sera défini par le rapport du nombre total de mâles sur le nombre total de rats mâles et femelles au sein d'un même lot, toutes portées confondues. Ce rapport est très stable sur une population sauvage et sa valeur normale est généralement de 102 à 108 mâles pour 100 femelles ([Hood 2005](#)), soit 50,4 à 51,9% de mâles nouveau-nés. Une diminution de ce rapport traduit une influence œstrogénique pendant la gestation. Tous les ratons seront examinés afin d'enregistrer des éventuelles malformations.

5.2.2.3. Croissance et prise alimentaire

Tous les animaux seront quotidiennement observés dès la naissance pour déceler toutes malformations. Durant toute l'expérimentation, le poids corporel sera mesuré une fois par semaine pour suivre la croissance des animaux. La consommation de nourriture et celle d'eau seront mesurées deux fois par semaine. Le contrôle journalier des animaux permettra de détecter toute anomalie du comportement et tout signe de toxicité ou de pathologies.

A partir du sevrage, la croissance des animaux sera suivie par pesées individuelles une fois par semaine jusqu'au sacrifice. Le comportement alimentaire des animaux est également sera suivi par mesure bihebdomadaire de la nourriture et de la consommation d'eau. Tout comme pour les mères, les animaux seront observés lors des soins pour déceler tout symptôme susceptible d'indiquer un état pathologique ou des troubles du comportement propres aux perturbateurs endocriniens (apathie, anxiété, agressivité ou hyperactivité). Une attention particulière sera portée à la santé buccale (croissance des dents) qui conditionne pour partie la prise alimentaire.

5.2.2.4. *Distance ano-génitale*

C'est la distance entre l'anus et la base de la papille génitale (pénis ou vagin) ; elle est considérée comme une méthode non invasive pour déterminer le degré d'exposition aux migrants d'emballage de type androgéniques durant la période néonatale. Elle sera mesurée au sevrage (J21) selon la méthode précédemment décrite par Boudalia et al ([Boudalia et al 2014](#)). Les rats seront maintenus immobiles dans un cylindre de rétention (Figure 5), puis des photos seront prises avec un appareil photo numérique. La distance est déterminée à partir des photos traitées grâce au logiciel de traitement d'image Visilog 6.9 (Noesis, Crolles, France), qui prend en compte le diamètre du cylindre comme mesure de référence (5 cm).

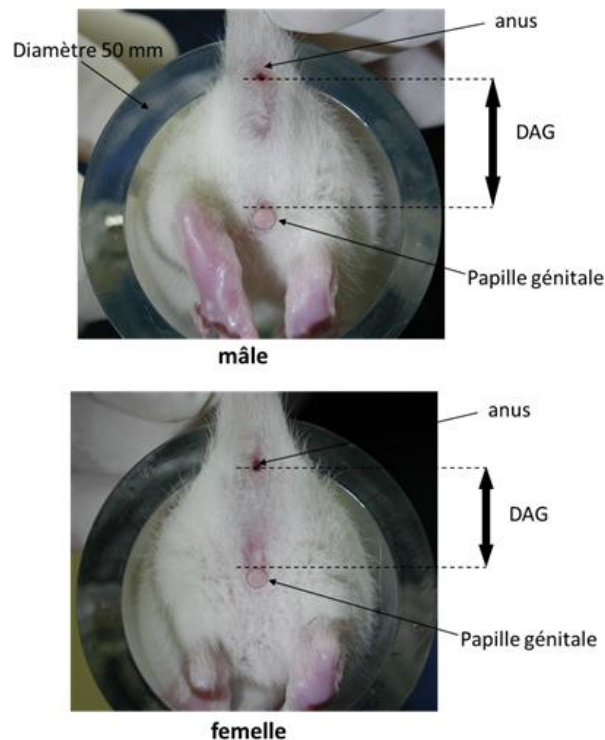


Figure 5 : Dispositif de mesure de la distance ano-génitale ([Boudalia et al 2014](#))

Elle est étroitement liée au développement pondéral de l'animal. C'est pourquoi les résultats seront généralement exprimés en valeurs relatives par rapport au poids du corps. Cependant, il existe un dimorphisme sexuel : chez les rats mâles, l'AGD est de 0,26 mm/g de poids corporel tandis que chez la femelle l'AGD est seulement de 0,13 mm/g de PC. Selon l'étude de Gallavan, normaliser l'AGD en divisant par le poids du corps ne suffit pas à compenser les différences de poids entre animaux, alors que si on exprime l'AGD par rapport à la racine cubique du poids du corps, on obtient une valeur constante de 2,8 chez les mâles et de 1,8 chez les femelles. Nous calculerons donc l'AGD index (AnoGenital Index), qui est le rapport $\text{AGD}/\text{Poids corporel}^{1/3}$ ([Gallavan et al 1999](#)).

5.2.2.5. Apparition de la puberté

Elle reflète l'apparition des caractères sexuels sous l'effet des œstrogènes et androgènes, elle est déterminée à partir de J23 sur la base de :

La séparation du prépuce chez les mâles : à un stade immature (jusqu'à l'âge de J25 environ) le pénis à une forme en V. A l'apparition de la puberté, vers l'âge de J25-J30, il passe par un stade intermédiaire, et son extrémité prend la forme d'un W lorsque le rat atteint l'âge adulte (au-delà de J80), c'est-à-dire quand il est finalement mûre, la forme du pénis s'apparente à un U (Figure 6).

L'ouverture vaginale chez les femelles : celle-ci apparaît entre J33 et J42 et correspond à la disparition de la membrane vaginale (ouverture vaginale), elle est le signe précurseur de la puberté. Les cycles apparaissent environ une semaine après l'ouverture vaginale (Figure 7).

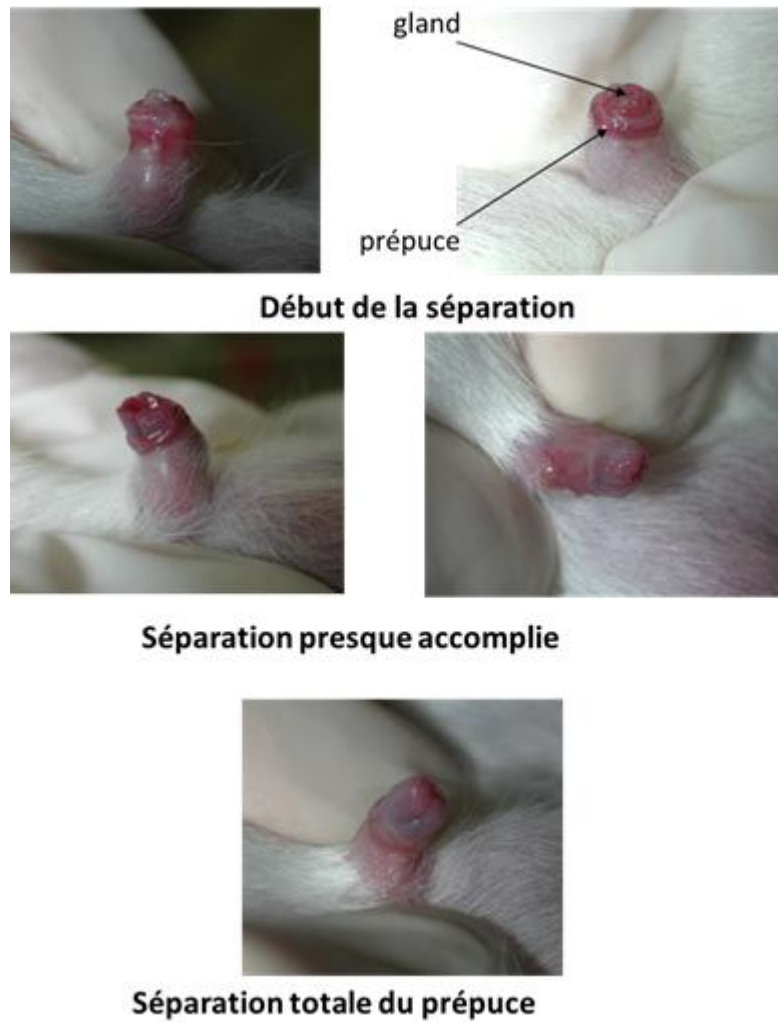


Figure 6 : Détermination du stade de séparation du prépus chez le rat



Figure 7: Détermination du stade de l'ouverture vaginale chez la ratte femelle au stade pré-pubertaire (A), apparition de la puberté (B) (Nah et al 2011)

5.2.2.6. Durée des cycles œstrals

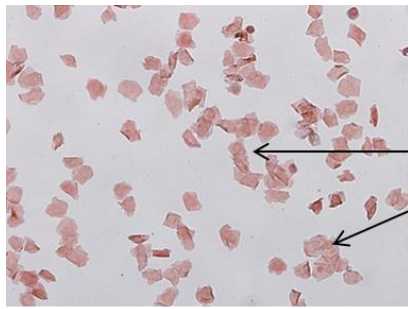
Chez le rat, la durée du cycle est de 4 jours. Elle peut augmenter sous l'effet des œstrogènes. L'aspect des frottis vaginaux varie au cours du cycle, le pourcentage de cellules vaginales cornifiées étant maximal au moment de l'ovulation, les frottis vaginaux seront réalisés chaque matin durant deux semaines pour évaluer l'impact sur les différentes étapes des cycles et sur la durée totale des cycles.

Frottis vaginaux : Le cycle œstral de la ratte comporte 4 phases classiques de durée bien définies : le proestrus [constitué de deux phases : early proestrus d'une durée de 55-57 heures et late proestrus 12-14 heures], est suivi de 25-27 heures d'œstrus au cours desquelles la rate accepte le mâle pour accouplement. En cas de non fécondation, suivent le Métoestrus (6 à 10 heures) et le Dioestrus (6 heures), au cours de ces différentes phases, l'utérus et le vagin présentent des modifications cellulaires, dont une hypertrophie marquée au moment de l'œstrus. Au niveau du vagin, ces modifications se traduisent par une kératinisation de l'épithélium vaginal qui est visible sur le frottis (Figure 8).

Réalisation du frottis : Les lames seront soigneusement lavées à l'alcool puis séchées et numérotées (n° de lame correspondant au n° de l'animal). L'extrémité d'un coton tige sera humidifiée dans du sérum physiologique puis introduit doucement dans le vagin en le tournant lentement, tout en maintenant bien l'animal immobile contre soi. Le prélèvement sera ensuite étalé sur la lame sans trop appuyer sur le coton tige et séché à l'air libre.

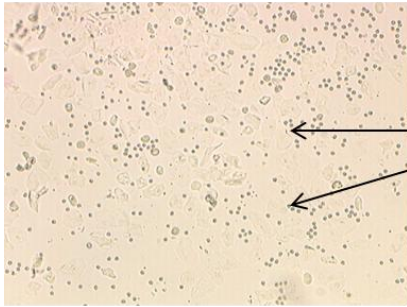
Les lames séchées seront déshydratées quelques secondes dans deux bains d'éthanol à 70% et 50% puis un bain d'eau distillée, les lames seront plongées dans un bain d'hématoxyline stabilisée durant 3 minutes. Après deux rinçages à l'eau distillée et deux minutes de révélation des noyaux au liquide bleuissant, les lames seront déshydratées par bains successifs d'eau distillée et d'éthanol à 70% et 95% respectivement. Après 3 minutes de bain de colorant de Shorr, les lames seront fixées par deux bains successifs d'éthanol à 100%. Les coupes colorées seront ensuite montées entre lame et lamelle et observées avec un microscope.

Interprétation : la chromatine des noyaux cellulaires sera colorée en bleu violet ou noir. Le cytoplasme des cellules malpighiennes éosinophiles sera rose orange, les cellules cynophiles apparaîtront en vert foncé et les cellules orangéophiles en orangé très brillant. Les leucocytes présents dans le frottis se caractérisent par un noyau bleu foncé et un cytoplasme bleu très clair. Le stade de chaque phase du cycle (La phase Dioestrus n'est pas colorée).



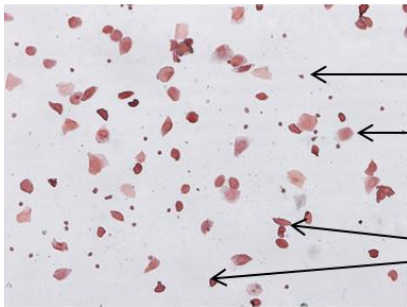
Oestrus

Cellules cornifiées
anucléées en amas



Dioestrus

Leucocytes

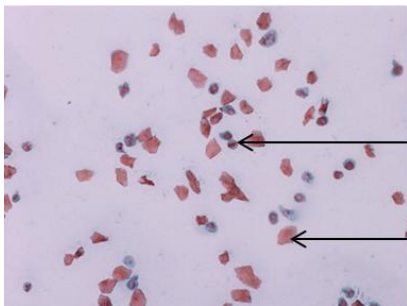


Early pro-oestrus

Cellules polynucléaires

Cellules cornifiées

Cellules épithéliales
nucléées et rondes



Late pro-oestrus

Cellules épithéliales
nucléées et rondes

Cellules cornifiées

Figure 8 : Interprétation des frottis chez la ratte

5.2.3. Sacrifice et prélèvements

5.2.3.1. Recueil de données avant le sacrifice

Au stade adulte, les animaux seront mis à jeûn la veille du sacrifice. Au matin les rats seront pesés, puis la glycémie sera mesurée grâce à un glucomètre (Accu-check) par ponction d'une goutte de sang à l'extrémité de la queue.

Test de tolérance au glucose : Il permettra de détecter la capacité de normaliser rapidement l'épisode hyper-glycémique induit par un bolus de glucose. Cette capacité dépend de l'intégrité d'une réponse métabolique qui inclut d'une part la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les cellules β pancréatiques, et d'autre part l'action hypoglycémiante de l'insuline dans le foie et les organes périphériques.

Une injection intra péritonéale de glucose (1 g/kg) sera réalisée (rats à jeun depuis 12h) le matin. La glycémie sera mesurée à l'aide d'un glucomètre par ponction d'une goutte de sang au bout de la queue (Accu-Check) à différents temps pour établir une cinétique: -30 min, 0 min, 30 min, 60 min, 120 min. Les résultats seront exprimés en (mg/dl) dans le sang.

Mesure de la masse grasse : La mesure de la masse grasse a été réalisée avec un Impédance-mètre. C'est un appareil utilisé pour déterminer la composition corporelle en masse grasse et maigre, grâce un courant alternatif de faible tension appliqué par des électrodes sous la peau, ces électrodes sont reliées à l'appareil de mesure qui analysera les données à l'aide d'un logiciel de modélisation ([Smith et al 2009](#)). L'animal sera anesthésié à l'isoflurane (AErrane[®], Baxter SA, Marepas, France) à 2,5% (v/v) dans l'oxygène, puis placé à plat sur l'abdomen sur une planche, les membres supérieurs et inférieurs à côté du corps, et la queue en prolongement vers le bas ; quatre électrodes seront placées sous la peau selon un axe antéro-postérieur (2 électrodes au niveau supérieur, 2 électrodes au niveau inférieur) (Figure 9).

Expression des résultats : L'impédance électrique mesurée sera rapportée à la masse du sujet (poids du corps le jour du sacrifice) et à sa taille (de la base de la tête au bout de la queue). Le résultat sera calibré en fonction de l'âge et du sexe, pour donner, en pourcentage, la proportion de graisse dans l'organisme.



Figure 9 : Dispositif de mesure de la masse grasse

5.2.3.2. Modalités des sacrifices et prélèvements sanguins

Les rats anesthésiés à l'isoflurane (AErrane®, Baxter SA, Marepas, France) à 2,5% (v/v) dans l'oxygène seront euthanasiés par exsanguination. Le sang sera prélevé par ponction à l'aorte abdominale et recueilli dans des tubes héparinés, le sérum est obtenu par centrifugation (9000 g, 10 min). Il sera aliquoté par fraction de 500 μ L dans des tubes Eppendorfs et puis stocké à -20 °C pour les dosages sériques.

5.2.3.3. Prélèvements d'organes et conditions de stockages

Le tissu adipeux blanc (péri-gonadique, périrénal, viscéral, sous-cutané) sera prélevé, pesé, et immédiatement conditionné pour les analyses : un échantillon du tissu périgonadique sera immédiatement conservé dans une solution tamponnée de formaldéhyde 4% (Labonord, Templemars, France) pour l'analyse histologique.

Le foie, le cerveau seront également prélevés, pesés et immédiatement congelés à -80°C pour des analyses histologiques ultérieures.

5.2.4. Analyse histologique et biochimique des organes

5.2.4.1. Etude du tissu adipeux

5.2.4.1.1. Analyse histologique (coloration à l'Hemalun/Eosine)

Les échantillons du tissu adipeux périgonadique préalablement inclus dans de la paraffine seront découpés au microtome (5 μm d'épaisseur) selon un axe antéro-postérieur, et coloré à l'Hemalun/Eosine.

- **Principe de coloration** : elle est basée sur une coloration nucléaire des substances basophiles par l'hématoxyline, et une coloration cytoplasmique (rose) par l'éosine (colorant acide). Cette coloration permet d'avoir une vue général et globale du tissu adipeux blanc périgonadique. Elle permet également de conclure si les cellules sont en hyperplasie et/ou hypertrophie par mesure de diamètre (μm) et d'aire (μm^2) (Figure 10).

Pour cela les lames seront observées sous microscope au grossissement $\times 10$ et des images seront prises avec une caméra. Différents paramètres morphométriques seront mesurés : l'aire de l'adipocyte, la surface, le volume et la densité.

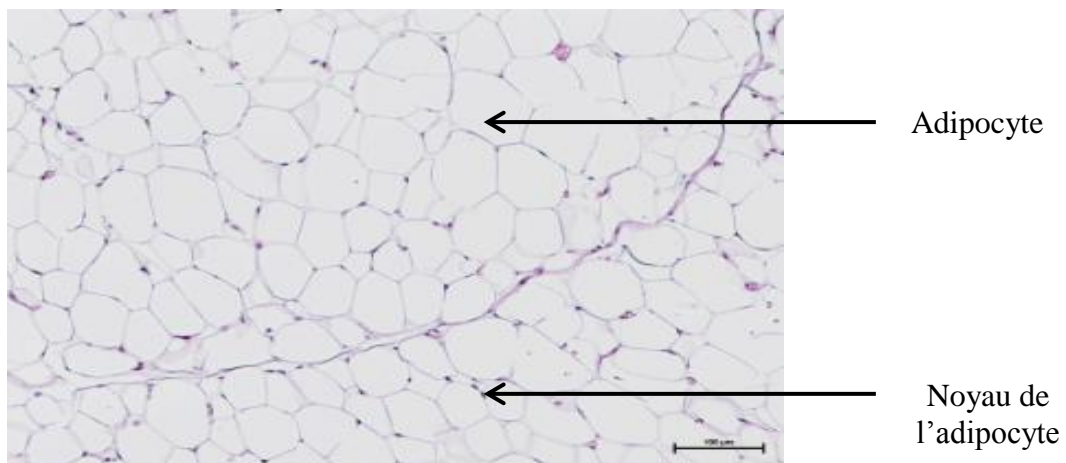


Figure 10: Coupe histologique de tissu adipeux péri-gonadique (grossissement $\times 20$ -Coloration Hemalun/Eosine)

Pour chaque échantillon, 5-7 coupes seront réalisées, et pour chaque coupe 8-15 photos seront prises. Le diamètre (r), l'aire et le volume des adipocytes seront calculés à partir de 10 mesures d'adipocytes prises au hasard pour chaque photo. Le volume sera calculé en utilisant la formule $\frac{4}{3}r^3$ [r : rayon ou le diamètre de l'adipocyte ([Penza et al 2006](#))], tandis que la densité

sera calculée à partir du nombre des adipocytes par champ (10 non chevauchant), et les résultats seront exprimés en nombre d'adipocyte/ μm^2 . Les résultats seront exprimés en μm pour le diamètre de l'adipocyte, en μm^2 pour l'aire de l'adipocyte, en μm^3 pour le volume de l'adipocyte et en nombre d'adipocytes/ mm^2 pour la densité adipocytaire.

5.2.5. Dosage biochimiques

5.2.5.1. Dosage de leptine

La leptine sérique sera dosée par spectrophotométrie à l'aide du kit ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Une quantité de 20-80 μL de sérum sera ajoutée aux puits de la microplaque qui seront déjà tapissés avec un anticorps de capture capable de lier spécifiquement l'antigène recherché selon les instructions du fabricant (Mediagnost, Allemagne). La concentration de leptine sera mesurée par spectrophotométrie ($\lambda = 450 \text{ nm}$, filtre de référence $\geq 590 \text{ nm}$) au lecteur de plaque Victor3V (Perlin Elmer, Courtaboeuf, France). Les résultats seront exprimés en (pg/mL).

5.2.5.2. Dosage des marqueurs métaboliques

Le cholestérol, Cholestérol-HDL (high-density lipoprotein), Cholestérol-LDL (low-density lipoprotein), Glu PAP seront mesurés à l'aide d'un analyseur biochimique. Une petite quantité de sérum (2,4-3 μL) est nécessaire pour chaque type de dosage qui est basé sur une méthode spectrophotométrique. Les résultats seront exprimés en (mmol/L).

5.3. Analyses statistiques des données

Dans toutes les analyses statistiques des études *in vivo*, la portée sera considérée comme l'unité de base (donnée expérimentale). Autrement dit, chacune des données analysées se réfèrera à une portée N, qu'il s'agisse de la moyenne des valeurs obtenues pour chaque animal d'une même portée, ou de la valeur obtenue pour un animal pris au hasard dans chaque portée (les données des femelles non prises seront éliminées lors des tests statistiques). Les résultats seront exprimés sous forme des moyennes \pm SEM (*Standard Error Mean*).

Suivi de la gestation et de la lactation : Le poids corporel, consommation de nourriture et prise d'eau pour les mères et la descendance seront analysés au moyen de modèles mixtes pour prendre en compte la nature des données : mesures répétées. Dans toutes les analyses, la partie

aléatoire du modèle inclut au moins un effet portée (ou mère) aléatoire pour tenir compte de la variabilité liée à la portée (respectivement la mère par ex). La partie fixe du modèle comprend les effets des facteurs « groupe de traitement » et « jour d'observation », ainsi que l'interaction groupe x jour. D'autres effets aléatoires seront envisagés ([Pinheiro et al 2012](#)).

La durée de gestation, le nombre de nouveau-nés par portée, le nombre d'implantation embryonnaire, les pertes post implantatoires, le cannibalisme (%) et le sex-ratio feront l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) suivi d'une comparaison des moyennes (test de Dunnett) quand les conditions de normalité et d'homogénéité des variances sont respectées, et le cas échéant d'une analyse de variance non paramétrique (Kruskal-Wallis) suivi du test de Mann-Whitney. L'effet sera considéré significatif pour des valeurs de $p < 0,05$.

Données d'observations et de mesures du sevrage à l'âge adulte (F1): Les données de croissance et développement relevées du sevrage à l'âge adulte, de même que toutes les données relatives aux analyses d'échantillons biologiques seront exprimées en valeur moyenne \pm SEM pour chaque groupe ; elles seront analysées indépendamment pour chaque sexe (un animal par portée/sexe). Lorsque les données prennent en compte plusieurs individus par portées (distance ano-génitale, ouverture vaginale), les analyses statistiques seront établies sur la moyenne \pm SEM de la valeur moyenne obtenue au sein de chaque portée (l'unité = portée).

L'index de la distance ano-génitale (AGD), et l'apparition de la puberté seront analysés séparément pour les mâles et les femelles sur la base d'une analyse de variance (Anova) suivie d'une comparaison des moyennes (test post-hoc : dunnett ou newman Keuls) quand les conditions de normalité et d'homogénéité des variances seront respectées, ou par une Anova non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de Mann-Whitney le cas échéant. Il en est de même pour l'analyse des données morphométriques (tissu adipeux, glandes salivaires), l'impédance-métrie ainsi que les données issues des analyses biochimiques (dosages sériques).

Les analyses de variances (Anova) et les comparaisons de moyennes (Dunnett, Mann-Whitney etc) seront été réalisées à l'aide du logiciel Minitab [version 16]. Le logiciel R sera utilisé pour les analyses au moyen d'un modèle linéaire mixte (nlme, Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-103).

6. Résultats attendus

Malheureusement pour des raisons techniques, on n'a pas pu mettre en place une expérimentation animale.

Cependant les résultats de cette expérimentation animale devraient nous permettre d'évaluer l'impact des contaminants alimentaires hormonaux sur l'adipogenèse. En premier lieu, ils identifieront les effets d'un migrant d'emballage œstrogène-mimétique/anti-androgène-mimétique sur la différenciation adipocytaire, et sur la synthèse de leptine (une cytokine qui joue un rôle déterminant dans la régulation de la prise alimentaire).

En second lieu, ils permettront peut-être de corréler un effet sur les préférences gustatives avec un effet sur le tissu adipeux, en particulier sur la synthèse de leptine.

Dans le même sens, et d'après la littérature une exposition aux migrants d'emballage peut altérer le développement du poids corporel, la différenciation des adipocytes, et également les taux sériques du glucose ([Hao et al 2013](#)).

Ces résultats sont également en accord avec des études épidémiologiques, où des corrélations entre les concentrations de BPA dans des fluides biologiques avec l'augmentation de poids corporel ont été enregistrées ([Zhang et al 2014](#)) ([Wang et al 2013](#)).

Néanmoins, le suivi de l'évolution de poids corporel et la détermination de la masse grasse permettront de vérifier l'hypothèse de «programmation fœtale» : qui suggère qu'une exposition périnatale puisse être à l'origine des problèmes de santé à l'âge adulte en lien avec l'influence périnatale des migrants d'emballage sur la différenciation et le développement de la masse grasse ([Heindel 2003](#)).

Aussi, plusieurs études montrent une augmentation significative du poids corporel corrélée à une augmentation de la masse adipeuse suite à des expositions aux migrants d'emballage ([Newbold 1995](#)) ([Somm et al 2009](#)).

En conclusion, notre protocole expérimental va nous permettre d'étudier les effets d'une exposition continue à un migrant d'emballage sur le développement du poids corporel, et puis faire le lien entre l'évolution du poids corporel avec le développement de la masse adipeuse. Et aussi chercher des corrélations entre le bilan sérique et l'activité endocrine ainsi que la différenciation de l'adipocyte.

Références bibliographiques

- Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Grote K, Chahoud I. 2006. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology* 227: 185-92
- Boudalia S, Berges R, Chabanet C, Folia M, Decocq L, et al. 2014. A multi-generational study on low-dose BPA exposure in Wistar rats: effects on maternal behavior, flavor intake and development. *Neurotoxicol Teratol* 41: 16-26
- Carrillo J, D., Martínez M, P., Tena M, T. 2008. Determination of phthalates in wine by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry: use of deuterated phthalates as internal standards. *J Chromatogr A*. 1181: 125 - 130.
- Curtis KS, Davis LM, Johnson AL, Therrien KL, Contreras RJ. 2004. Sex differences in behavioral taste responses to and ingestion of sucrose and NaCl solutions by rats. *Physiol Behav* 80: 657-64
- Curtis KS, Stratford JM, Contreras RJ. 2005. Estrogen increases the taste threshold for sucrose in rats. *Physiol Behav* 86: 281-6
- Del Carlo M, Pepe A, Sacchetti G, Compagnone D, Mastrocola D, Cichelli A. 2008. Determination of phthalate esters in wine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem* 111: 771 - 777.
- EFSA. 2005. Avis du groupe scientifique sur les additifs alimentaires, les arômes, les auxiliaires technologiques et les matériaux en contact avec les aliments (AFC) à la demande de la Commission concernant le di (2-éthylhexyl) phtalate (DEHP) utilisé dans les matériaux en contact avec les aliments. *EFSA Journal* 243.
- Endrizzi A, Karbowski T, Debeaufort F, Chassagne D, Chagnon M-C, Voilley A. 2009. Transferts de matière au travers des emballages au contact de produits alimentaires. *Ind. Agro. Agri.*: 11-16.

- Ferguson SA, Delclos KB, Newbold RR, Flynn KM. 2003. Dietary ethinyl estradiol exposure during development causes increased voluntary sodium intake and mild maternal and offspring toxicity in rats. *Neurotoxicol Teratol* 25: 491-501
- Gaillard R, C. 2003. Le tissu adipeux: un véritable organe endocrine. *Revue Médicale Suisse*. 61: 326-329.
- Gallavan RH, Jr., Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL. 1999. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reproductive toxicology* 13: 383-90
- Geary N. 2001. Estradiol, CCK and satiation. *Peptides* 22: 1251-63
- Hao C, Cheng X, Guo J, Xia H, Ma X. 2013. Perinatal exposure to diethyl-hexyl-phthalate induces obesity in mice. *Front Biosci (Elite Ed)* 5: 725-33
- Hao C, Cheng X, Xia H, Ma X. 2012. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. *Bioscience reports* 32: 619-29
- Harris C, A., Henttu P, Parker M, G., Sumpter J, P. 1997. The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environ Health Perspect.*: 105: 802 - 11.
- Heindel JJ. 2003. Endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Toxicol Sci* 76: 247-9
- Hood E. 2005. Are EDCs blurring issues of gender? *Environ Health Perspect* 113: A670-7
- Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, et al. 2002. NTP center for the evaluation of health risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate. *Reprod Toxicol*: 16: 489 - 527.
- Kawai K, Sugimoto K, Nakashima K, Miura H, Ninomiya Y. 2000. Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11044-9
- Kristensen K, Pedersen SB, Richelsen B. 1999. Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 624-30
- Kus I, Colakoglu N, Ogeturk M, Kus MA, Ozen OA, Sarsilmaz M. 2007. Effects of testosterone on leptin production in anterior pituitary cells of rats: an immunohistochemical study. *Arch Androl* 53: 79-82

- Lee KI, Chiang CW, Lin HC, Zhao JF, Li CT, et al. 2015. Maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure deregulates blood pressure, adiposity, cholesterol metabolism and social interaction in mouse offspring. *Archives of toxicology*
- Moore N, P. . 2000. The oestrogenic potential of phthalate esters. *Reprod Toxicol* 14: 183 - 92.
- Nah WH, Park MJ, Gye MC. 2011. Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice. *Clinical and experimental reproductive medicine* 38: 75-81
- Newbold R. 1995. Cellular and molecular effects of developmental exposure to diethylstilbestrol: implications for other environmental estrogens. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7: 83-7
- Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Jefferson WN. 2007. Perinatal exposure to environmental estrogens and the development of obesity. *Mol Nutr Food Res* 51: 912-7
- Peijnenburg W, J,G,M, , Struijs J. 2006. Occurrence of phthalate esters in the environment of the Netherlands. *Ecotoxicol Environ Safe* 63: 204 - 15.
- Penza M, Montani C, Romani A, Vignolini P, Pampaloni B, et al. 2006. Genistein affects adipose tissue deposition in a dose-dependent and gender-specific manner. *Endocrinology* 147: 5740-51
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, Team RDC. 2012. nlme. In *Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-103*
- Shimizu Y, Yamazaki M, Nakanishi K, Sakurai M, Sanada A, et al. 2003. Enhanced responses of the chorda tympani nerve to sugars in the ventromedial hypothalamic obese rat. *J Neurophysiol* 90: 128-33
- Smith D, Jr., Johnson M, Nagy T. 2009. Precision and accuracy of bioimpedance spectroscopy for determination of in vivo body composition in rats. *International journal of body composition research* 7: 21-26
- Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, Cederroth CR, Combescure C, et al. 2009. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* 117: 1549-55

- Trasande L, Attina TM, Sathyanarayana S, Spanier AJ, Blustein J. 2013. Race/ethnicity-specific associations of urinary phthalates with childhood body mass in a nationally representative sample. *Environmental health perspectives* 121: 501-6
- Wang H, Zhou Y, Tang C, He Y, Wu J, et al. 2013. Urinary Phthalate Metabolites Are Associated with Body Mass Index and Waist Circumference in Chinese School Children. *PLoS ONE* 8(2): e56800.
- Zhang Y, Meng X, Chen L, Li D, Zhao L, et al. 2014. Age and sex-specific relationships between phthalate exposures and obesity in Chinese children at puberty. *PLoS ONE* 9: e104852