



**HAL**  
open science

## Exposition des nouveau-nés prématurés aux parabènes via l'administration des médicaments

Guillaume Binson

► **To cite this version:**

Guillaume Binson. Exposition des nouveau-nés prématurés aux parabènes via l'administration des médicaments. Médecine humaine et pathologie. Université de Poitiers, 2020. Français. NNT : 2020POIT1406 . tel-03359982

**HAL Id: tel-03359982**

**<https://theses.hal.science/tel-03359982v1>**

Submitted on 30 Sep 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine et Pharmacie)  
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale « *Sciences Biologiques & Santé* »

Secteur de Recherche : Recherche clinique, Innovation technologique, Santé publique

Présentée par :

M. BINSON Guillaume

\*\*\*\*\*

EXPOSITION DES NOUVEAU-NES PREMATURES AUX PARABENES VIA  
L'ADMINISTRATION DES MEDICAMENTS

\*\*\*\*\*

Directeur de Thèse : Pr. Antoine Dupuis & Dr. Nicolas Venisse

\*\*\*\*\*

Soutenue le 08/12/2020 à Poitiers

devant la Commission d'Examen

\*\*\*\*\*

## JURY

Valérie SAUTOU

Nicolas SIMON

Sylvie CRAUSTE-MANCIET

Jean-Bernard GOUYON

Nicolas VENISSE

Antoine DUPUIS

.....  
PU-PH (Université de Clermont-Ferrand)

PU-PH (Université de Lille)

PU-PH (Université de Bordeaux)

PU-PH (Université de La Réunion)

Praticien Hospitalier (CHU de Poitiers)

PU-PH (Université de Poitiers)

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Co-directeur

Directeur

# THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine et Pharmacie)  
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale « *Sciences Biologiques & Santé* »

Secteur de Recherche : Recherche clinique, Innovation technologique, Santé publique

Présentée par :

M. BINSON Guillaume

\*\*\*\*\*

EXPOSITION DES NOUVEAU-NES PREMATURES AUX PARABENES VIA  
L'ADMINISTRATION DES MEDICAMENTS

\*\*\*\*\*

Directeur de Thèse : Pr. Antoine Dupuis & Dr. Nicolas Venisse

\*\*\*\*\*

Soutenue le 08/12/2020 à Poitiers

devant la Commission d'Examen

\*\*\*\*\*

## JURY

|                        |   |              |
|------------------------|---|--------------|
| Valérie SAUTOU         | PU-PH (Université de Clermont-Ferrand)  | Rapporteur   |
| Nicolas SIMON          | PU-PH (Université de Lille)             | Rapporteur   |
| Sylvie CRAUSTE-MANCIET | PU-PH (Université de Bordeaux)          | Examineur    |
| Jean-Bernard GOUYON    | PU-PH (Université de La Réunion)        | Examineur    |
| Nicolas VENISSE        | Praticien Hospitalier (CHU de Poitiers) | Co-directeur |
| Antoine DUPUIS         | PU-PH (Université de Poitiers)          | Directeur    |

## Remerciements

*« Lorsqu'une question soulève des opinions violemment contradictoires, on peut assurer qu'elle appartient au domaine de la croyance et non à celui de la connaissance. »*

Voltaire

*« Les convictions sont des ennemis de la vérité plus dangereux que les mensonges. »*

Nietzsche

# TABLE DES MATIERES

|  |           |
|--|-----------|
| Liste des abbreviations et acronymes.....  | 1         |
| Liste des tableaux .....   | 3         |
| Liste des figures.....   | 5         |
| Présentation de la thèse .....   | 7         |
| <b>Première partie : Synthèse bibliographique .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>Chapitre I : Les perturbateurs endocriniens.....</b>  | <b>9</b>  |
| 1. Généralités .....   | 9         |
| 1.1. Le système endocrinien.....   | 9         |
| 1.2. Les perturbateurs endocriniens.....   | 10        |
| 1.3. Sources et voies d'exposition aux perturbateurs endocriniens .....                                | 12        |
| 1.4. Mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens.....  | 13        |
| 1.4.1. Effets à faible dose et relation dose-réponse non monotone des perturbateurs endocriniens ..... | 15        |
| 1.4.2. Effets transgénérationnels.....   | 17        |
| 1.4.3. Effets cocktails.....   | 18        |
| 1.4.4. Effets de l'exposition in utero aux perturbateurs endocriniens.....                             | 19        |
| <b>Chapitre 2 : Enjeux de l'exposition des nouveau-nés aux perturbateurs endocriniens .....</b>        | <b>21</b> |
| 1. L'hypothèse DOHAD.....  | 21        |
| 2. Fenêtre d'exposition.....   | 21        |
| 3. Exposition des nouveau-nés aux perturbateurs endocriniens.....                                      | 23        |
| 3.1. Via l'alimentation.....   | 23        |
| 3.2. Via les produits de santé .....   | 24        |
| 3.3. Autres sources d'exposition.....  | 25        |
| <b>Chapitre 3 : Les parabènes.....</b>   | <b>27</b> |
| 1. Structure et propriétés physicochimiques.....   | 27        |
| 2. Toxicocinétique .....   | 28        |
| 2.1. Absorption et distribution .....  | 29        |
| 2.1.1. Voie orale .....  | 29        |
| 2.1.2. Voie cutanée .....  | 29        |
| 2.2. Métabolisme.....  | 30        |
| 2.3. Elimination.....  | 31        |
| 3. Effets perturbateurs endocriniens .....   | 32        |
| 4. Utilisation et présence dans l'environnement.....   | 34        |
| 4.1. Présence dans l'alimentation .....  | 34        |
| 4.2. Présence dans les cosmétiques et les produits d'hygiène corporelle .....                          | 35        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.3. Présence dans les médicaments .....  | 35        |
| 5. Exposition des nouveau-nés aux parabènes via les médicaments .....   | 36        |
| <b>Deuxième partie: travaux personnels .....</b>  | <b>38</b> |
| Objectifs de la thèse.....  | 39        |
| <b>Chapitre 1 : exposition des nouveau-nés prématurés aux parabènes via l'administration des médicaments .....</b>    | <b>40</b> |
| Etude préliminaire .....  | 40        |
| 1. Introduction.....  | 40        |
| 2. Matériel et méthodes.....  | 43        |
| 2.1. Identification des médicaments contenant des parabènes et de leur teneur .....                                   | 43        |
| 3. Résultats.....   | 44        |
| 4. Discussion.....  | 49        |
| 5. Conclusion .....   | 52        |
| Etude prospective multicentrique.....   | 53        |
| 1. Contexte.....  | 53        |
| 2. Matériel et méthode .....  | 53        |
| 2.1. Type d'étude .....   | 53        |
| 2.2. Critères d'inclusion .....   | 54        |
| 2.3. Critères de non-inclusion.....   | 54        |
| 2.4. Recueil des données .....  | 54        |
| 2.5. Identification des médicaments contenant des parabènes .....   | 55        |
| 2.6. Analyse des données .....  | 56        |
| 3. Résultats.....   | 57        |
| 3.1. Population d'étude.....  | 57        |
| 3.2. Médicaments contenant des parabènes .....  | 59        |
| 3.3. Exposition des nouveau-nés aux parabènes via les médicaments .....   | 67        |
| 3.3.1. Prévalence d'exposition .....  | 67        |
| 3.3.2. Quantification de l'exposition .....   | 70        |
| 4. Discussion.....  | 75        |
| 5. Conclusion .....   | 77        |
| <b>Chapitre 2 : Méthodes de dosages ultrasensibles permettant la quantification des parabènes dans le plasma.....</b> | <b>80</b> |
| 1. Contexte.....  | 80        |
| 2. Matériels et méthodes.....   | 81        |
| 2.1. Produits chimiques et réactifs .....   | 81        |
| 2.2. Préparation des solutions .....  | 81        |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 2.3.   | Préparation des réactifs et des solutions standards ..... | 82 |
| 2.4.   | Préparation des échantillons.....                         | 82 |
| 2.5.   | Analyse par UHPLC-MS/MS.....                              | 83 |
| 2.5.1. | Séparation des composés .....                             | 83 |
| 2.5.2. | Spectrométrie de masse.....                               | 84 |
| 2.6.   | Validation de la méthode .....                            | 84 |
| 2.7.   | Applicabilité de la méthode .....                         | 86 |
| 3.     | Résultats.....  | 86 |
| 3.1.   | Conditions de spectrométrie.....                          | 86 |
| 3.2.   | Validation de la méthode .....                            | 87 |
| 3.3.   | Application de la méthode.....                            | 90 |
| 4.     | Discussion.....   | 91 |
| 5.     | Conclusion .....  | 94 |

### **Chapitre 3 : Stratégies d'éviction des parabènes dans les médicaments, le cas des préparations ... 95**

|   |  |     |
|---|--|-----|
| Identification des alternatives aux médicaments contenant des parabènes identifiés dans l'étude prospective multicentrique..... |  | 95  |
| 1.  | Introduction.....                                | 95  |
| 2.  | Identification des alternatives.....             | 96  |
| 2.1.  | Cas du Ferrostrane®.....                         | 96  |
| 2.2.  | Cas du paracétamol.....                          | 96  |
| 2.3.  | Cas de la gentamicine .....                      | 97  |
| 2.4.  | Cas du Gaviscon® .....                           | 97  |
| 2.5.  | Cas de la Mycostatine® et de la Fungizone® ..... | 97  |
| 2.6.  | Cas de la Josacine® .....                        | 98  |
| 2.7.  | Cas du Lasilix®.....                             | 98  |
| 2.8.  | Cas du Levocarnil®.....                          | 99  |
| 2.9.  | Cas de l'Un-Alfa® .....                          | 99  |
| 2.10.   | Cas du Vedrop® .....                             | 99  |
| 2.11.   | Cas de l'Epivir® et du Viramune®.....            | 100 |
| 2.12.   | Cas du Keppra® et de la Depakine®.....           | 101 |
| 2.13.   | Cas du Flagyl® .....                             | 101 |
| 2.14.   | Cas de la digoxine .....                         | 102 |
| 2.15.   | Cas de la Rifadine® .....                        | 102 |
| 2.16.   | Cas du Bactrim®.....                             | 102 |
| 2.17.   | Cas de l'Oracilline®.....                        | 103 |
| 2.18.   | Cas du Théralène® .....                          | 103 |



|  |   |            |
|--|---|------------|
| 2.19.  | Cas de la Dépakine® .....   | 103        |
| 2.20.  | Cas du Propranolol Rosemont.....  | 104        |
| 2.21.  | Cas de la Dompéridone.....  | 104        |
| 2.22.  | Cas du Locapred®.....   | 104        |
| 2.23.  | Cas du potassium.....   | 105        |
| 3.   | Discussion.....   | 105        |
| Preparation and physicochemical stability of liquid oral dosage forms free of potentially harmful excipient designed for pediatric patients .....            |   | 106        |
| 1.   | Introduction.....   | 106        |
| 2.   | Matériel et méthode .....   | 107        |
| 2.1.   | Réactifs.....   | 107        |
| 2.2.   | Etude de faisabilité.....   | 108        |
| 2.3.   | Etude de stabilité .....  | 109        |
| 2.4.   | Développement des méthodes analytiques et validation.....                           | 109        |
| 2.4.1.   | Courbes de calibration .....  | 110        |
| 2.4.2.   | Linéarité et effets matrices .....  | 110        |
| 2.4.3.   | Exactitude et limite de quantification.....   | 111        |
| 2.4.4.   | Spécificité et capacité indicatrice de stabilité.....                               | 111        |
| 3.   | Résultats.....  | 111        |
| 3.1.   | Validation des méthodes analytiques .....   | 111        |
| 3.2.   | Etudes de faisabilité et de stabilité.....  | 115        |
| 4.   | Discussion.....   | 118        |
| <b>Discussion générale et conclusion .....</b>   |   | <b>121</b> |
| 1.   | Exposition des nouveau-nés aux parabènes via l'administration des médicaments ..... | 122        |
| 2.   | Le défi des alternatives .....  | 123        |
| 3.   | Vers l'évaluation de la part attribuable aux médicaments : le projet EXEMPT.....    | 126        |
| 4.   | Conclusion .....  | 129        |
| Bibliographie.....   |   | 130        |
| Annexe 1 : Exposition des nouveau-nés aux parabènes via les médicaments administrés durant leur hospitalisation.....   |   | 147        |
| Annexe 2 : Preparation and physicochemical stability of liquid oral dosage forms free of potentially harmful excipient designed for pediatric patients ..... |   | 156        |
| Annexe 3 : Poster présenté au congrès snphpu 2020.....   |   | 170        |
| Annexe 4 : Communication orale au congrès SNPHPU 2020.....   |   | 172        |
| Résumé de la thèse .....   |   | 184        |
| Abstract.....  |   | 186        |

## LISTE DES ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

|                              |  |
|------------------------------|--|
| <b>AFSSAPS</b>               | Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé |
| <b>AG</b>                    | Age gestationnel   |
| <b>ANSM</b>                  | Agence Nationale du Sécurité du Médicament                   |
| <b>ATU</b>                   | Autorisation Temporaire d'Utilisation                        |
| <b>BPA</b>                   | Bisphenol A  |
| <b>BuPB</b>                  | Butylparabène  |
| <b>CQ</b>                    | Contrôle Qualité   |
| <b>DCI</b>                   | Dénomination Commune Internationale                          |
| <b>DDE</b>                   | Dichlorodiphénylesichloroéthylène                            |
| <b>DEHP</b>                  | Di(ethylhexyl)phtalate                                       |
| <b>DES</b>                   | Distilbène   |
| <b>DEX</b>                   | Dexaméthasone  |
| <b>DJA</b>                   | Dose Journalière Admissible                                  |
| <b>DOHAD</b>                 | Developmental Origin of Health and Diseases                  |
| <b>EEN</b>                   | Excipient à effet notoire                                    |
| <b>EFSA</b>                  | European Food Security Agency                                |
| <b>EMA</b>                   | European Medicine Agency                                     |
| <b>Er<math>\alpha</math></b> | Récepteur aux œstrogènes $\alpha$                            |
| <b>Er<math>\beta</math></b>  | Récepteur aux œstrogènes $\beta$                             |
| <b>ESI</b>                   | ElectroSpray Ionisation                                      |
| <b>EtPB</b>                  | Ethylparabène  |
| <b>F</b>                     | Biodisponibilité   |
| <b>FDA</b>                   | Federal Drug Agency  |
| <b>H2O2</b>                  | Peroxyde d'hydrogène   |
| <b>HCB</b>                   | Hexachlorobenzène  |
| <b>hCE1/2</b>                | Human Carboxylesterases 1 & 2                                |
| <b>HCl</b>                   | Acide chlorhydrique  |
| <b>HCTZ</b>                  | Hydrochlorothiazide  |
| <b>HPLC</b>                  | High Performance Liquid Chromatography                       |
| <b>ICH</b>                   | International Conference for Harmonization                   |

|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>LLOQ</b>          | Lowest Limit of Quantification                                     |
| <b>LOAEL</b>         | Lowest Observed Adverse Effect Level                               |
| <b>LOD</b>           | Limit of Detection   |
| <b>MEHP</b>          | Mono(ethylhexyl)phtalate   |
| <b>MePB</b>          | Methylparabène   |
| <b>NaOH</b>          | Hydroxyde de sodium  |
| <b>NOAEL</b>         | No Observed Adverse Effect Level                                   |
| <b>NTP</b>           | National Toxicology Program  |
| <b>OMS</b>           | Organisation Mondiale de la Santé                                  |
| <b>PA</b>            | Principe actif   |
| <b>PCBs</b>          | Polychlorobiphényles   |
| <b>PE</b>            | Perturbateur endocrinien   |
| <b>PFOA</b>          | Perfluorooctanoic acid   |
| <b>PFOS</b>          | Perfluorooctanesulfonic acid                                       |
| <b>pHBA</b>          | Acide para-hydroxybenzoïque  |
| <b>pHHA</b>          | Acide para-hydroxyhippurique                                       |
| <b>PHT</b>           | Phénytoïne   |
| <b>PrPB</b>          | Propylparabène   |
| <b>PVC</b>           | Polychlorure de vinyle   |
| <b>PXR</b>           | Pregnane X Receptor  |
| <b>R<sup>2</sup></b> | Coefficient de détermination                                       |
| <b>RTU</b>           | Recommandation Temporaire d'Utilisation                            |
| <b>SA</b>            | Semaine d'aménorrhée   |
| <b>SCENIHR</b>       | Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks |
| <b>SPE</b>           | Solid Phase Extraction   |
| <b>SPL</b>           | Spironolactone   |
| <b>UGT</b>           | UDP-Glucuronosyltransferase  |
| <b>UPLC</b>          | Ultra Performance Liquid Chromatography                            |
| <b>UV</b>            | Ultraviolet  |

# LISTE DES TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1: Classification des perturbateurs endocriniens. Adapté de [11].....  | 12 |
| Tableau 2: Propriétés physicochimiques du méthyle, éthyle, propyle et butylparabène. Issu de [112–115]. .....                                | 28 |
| Tableau 3: Effets perturbateurs endocriniens des parabènes chez l'animal. Adapté de [138]. .....   | 33 |
| Tableau 4: Mots clés utilisés pour la recherche par excipient dans la base de données Thériaque® ..  | 43 |
| Tableau 5: Répartition des parabènes dans les spécialités pharmaceutiques. ....  | 45 |
| Tableau 6: Proportion des formes galéniques parmi les spécialités identifiées comme contenant des parabènes. ....                            | 45 |
| Tableau 7: Caractéristiques de la population d'étude (n = 22). ....  | 46 |
| Tableau 8: Teneur en parabènes des médicaments prescrits et identifiés comme contenant des parabènes (µg/mL; moyenne ± écart-type) .....     | 47 |
| Tableau 9: Exposition des nouveau-nés hospitalisés aux parabènes via les médicaments. ....   | 48 |
| Tableau 10: Mots-clés utilisés pour la recherche par excipients dans la base de données Thériaque® .....                                     | 55 |
| Tableau 11: Caractéristiques démographiques de la population d'étude .....   | 57 |
| Tableau 12: Répartition des inclusions selon les centres et l'âge gestationnel à la naissance .....  | 58 |
| Tableau 13: Médicaments contenant des parabènes prescrits à la population d'étude .....  | 60 |
| Tableau 14: Nombre de DCI utilisées par centre. ....   | 63 |
| Tableau 15: Nombre de DCI utilisées par AG .....   | 64 |
| Tableau 16: Répartition des prescriptions de médicaments contenant des parabènes selon les centres d'inclusion et l'âge gestationnel .....   | 66 |
| Tableau 17: Prévalence d'exposition aux médicaments contenant des parabènes. ....  | 67 |
| Tableau 18: Prévalence d'exposition en fonction des centres d'inclusion. ....  | 68 |
| Tableau 19: Fréquences de prescriptions des médicaments contenant des parabènes prescrits chez les nouveau-nés en fonction des centres ..... | 69 |
| Tableau 20: Exposition moyenne aux parabènes via l'administration des médicaments (en mg/kg/j) 70  |    |
| Tableau 21: Valeurs d'expositions aux parabènes selon le centre d'inclusion (en mg/kg/j). ....   | 71 |
| Tableau 22: Nombre moyen de jours d'exposition aux parabènes selon l'âge gestationnel. ....  | 72 |

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 23: Composition de la matrice plasmatique synthétique utilisée .....  | 82  |
| Tableau 24: Paramètres spectrométriques des parabènes.....  | 87  |
| Tableau 25: Résumé des coefficients de détermination, pentes et ordonnées à l'origine des droites de calibration préparées avec le plasma synthétique (n=5) .....                           | 88  |
| Tableau 26: Exactitude et précision intra- et interday de chaque analyte dans la matrice plasma synthétique (n=5).....  | 88  |
| Tableau 27: Rendements, effets matrices et recouvrements de l'extraction des parabènes, avec correction par leur étalon interne, dans le plasma synthétique (%). .....                      | 90  |
| Tableau 28: Concentrations plasmatiques en parabènes obtenues durant l'essai d'applicabilité de la méthode.....   | 90  |
| Tableau 29: Comparaison des limites de quantification des parabènes dans le plasma ou le sérum..  | 92  |
| Tableau 30 : Caractéristiques des différentes méthodes analytiques développées pour déterminer les concentrations en dexaméthasone, hydrochlorothiazide, phénytoïne et spironolactone ..... | 110 |
| Tableau 31: Paramètres de validation obtenus l'étude de la linéarité.....   | 112 |
| Tableau 32: Paramètres de validation obtenus durant l'évaluation de l'exactitude des méthodes analytiques .....   | 112 |
| Tableau 33: Caractéristiques associées aux chromatogrammes 3D obtenus durant l'étude de dégradation forcée.....   | 115 |
| Tableau 34: Paramètres physiques évalués durant l'étude de stabilité, quel que soit le type de condition de stockage (réfrigéré ou température ambiante).....                               | 117 |
| Tableau 35: Propositions de stratégies alternatives aux médicaments contenant des parabènes ...   | 125 |

## LISTE DES FIGURES

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1: Représentation schématique des organes endocriniens. Issu de [1].  | 9   |
| Figure 2 : Organes pouvant être affectés par les perturbateurs endocriniens. Adapté de [14].   | 13  |
| Figure 3: Exemples de courbe dose-réponse monotone   | 15  |
| Figure 4 : Exemples de courbes dose-réponse non-monotones. A. En cloche; B. En U; C. Multiphasique. Issu de [22].  | 16  |
| Figure 5 : Périodes de vulnérabilité aux perturbateurs endocriniens des principaux organes et systèmes chez l'homme. Issu de [78].   | 22  |
| Figure 6 : Structure chimique du méthyl-, éthyl-, propyl- et butylparabène et de l'acide parahydroxybenzoïque  | 27  |
| Figure 7: Voies de métabolisme des parabènes. Issu de [120].   | 31  |
| Figure 8: Répartition des médicaments contenant des parabènes selon leur forme galénique   | 61  |
| Figure 9: Répartition des médicaments selon leur classe ATC.   | 62  |
| Figure 10: Nombre de lignes de prescriptions par centre.   | 64  |
| Figure 11: Répartition des prescriptions selon l'âge gestationnel à la naissance.  | 65  |
| Figure 12: Distribution des doses journalières moyennes en parabènes selon l'âge gestationnel. A: Méthylparabène; B: Ethylparabène; C: Propylparabène  | 73  |
| Figure 13: Distribution des doses journalières moyennes en parabènes selon le poids de naissance. A: Méthylparabène; B: Ethylparabène; C: Propylparabène   | 74  |
| Figure 14: Gradient d'élution utilisé pour la séparation chromatographique   | 84  |
| Figure 15: Exemple de chromatogramme obtenu pour les quatre parabènes (bleu) et leur étalon interne (rose). A: Méthylparabène; B: Ethylparabène; C: Propylparabène; D: Butylparabène.  | 89  |
| Figure 16: Chromatogrammes 3D obtenus pour les suspensions buvables de dexaméthasone (DEX) après application de différentes conditions de stress. (a) Pas de stress; (b) HCl 0,5M à 80°C pendant 30 minutes; (c) NaOH 0,1M à 80°C pendant 10 minutes; (d) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% à 80°C pendant 4 heures ; (e) 80°C pendant 4 heures. SF : front de solvant ; DP : produit de dégradation. | 113 |
| Figure 17: Chromatogrammes 3D obtenus pour les suspensions buvables d'hydrochlorothiazide (HCTZ) après application de différentes conditions de stress. (a) Pas de stress; (b) HCl 1M à 80°C pendant 1 heure; (c) NaOH 1M à 80°C pendant 1 heure; (d) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% à 80°C pendant 4 heures ; (e) 80°C pendant 4 heures. SF : front de solvant ; DP : produit de dégradation.     | 114 |
| Figure 18: Chromatogrammes 3D obtenus pour les suspensions buvables de phénytoïne (PHT) après application de différentes conditions de stress. (a) Pas de stress; (b) HCl 0,5M à 80°C pendant 4  |     |

heures; (c) NaOH 1M à 80°C pendant 4 heures; (d) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% à 80°C pendant 4 heures ; (e) 80°C pendant 4 heures. SF : front de solvant ; DP : produit de dégradation..... 114

Figure 19: Chromatogrammes 3D obtenus pour les suspensions buvables de spironolactone (SPL) après application de différentes conditions de stress. (a) Pas de stress; (b) HCl 0,5M à 80°C pendant 1 heure; (c) NaOH 0,1M à 80°C pendant 5 minutes; (d) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% à 80°C pendant 4 heures ; (e) 80°C pendant 4 heures. SF : front de solvant ; DP : produit de dégradation..... 115

Figure 20: Stabilité chimique de la dexaméthasone, l'hydrochlorothiazide, la phénytoïne et la spironolactone dans les suspensions buvables. Les valeurs sont exprimées en pourcentage moyen restant ± écart-type..... 116

Figure 21: Modifications de pH pour les suspensions de dexaméthasone, hydrochlorothiazide, phénytoïne et spironolactone, quel que soit la condition de stockage. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type..... 117

## **PRESENTATION DE LA THESE**

Les travaux présentés dans ce document ont été réalisés au sein de l'axe de recherche en santé environnementale HEDEX (Health – Endocrine Disruptors – EXposome) dirigé par Madame le Professeur Virginie Migeot. Cet axe fait partie du Centre d'Investigation Clinique INSERM 1402, dirigé par Monsieur le Professeur René Robert.

Ils ont été effectués durant mon assistantat hospitalo-universitaire, au Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers et à l'Université de Poitiers.

Ces travaux portent sur l'exposition aux perturbateurs endocriniens (PE), ici les parabènes, des nouveau-nés hospitalisés via l'administration des médicaments.

Dans une première partie, nous évoquerons l'état des connaissances actuelles sur les perturbateurs endocriniens en général et les enjeux associés à leur exposition chez les nouveau-nés. Puis, nous définirons une famille de PE en particulier, les parabènes, avec les données actuelles d'exposition chez les nouveau-nés.

Dans la seconde partie, nous présenterons les travaux qui ont été menés durant cette thèse. Tout d'abord, nous présenterons les résultats obtenus durant deux études portant sur l'exposition des nouveau-nés aux parabènes via l'administration des médicaments. Puis, nous présenterons la méthode de dosage que nous avons développée et validée dans l'objectif de pouvoir identifier la part attribuable aux médicaments dans l'exposition aux parabènes. Enfin, nous présenterons les stratégies de prise en charge alternatives, sans parabènes, que nous avons élaborées.



# **PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

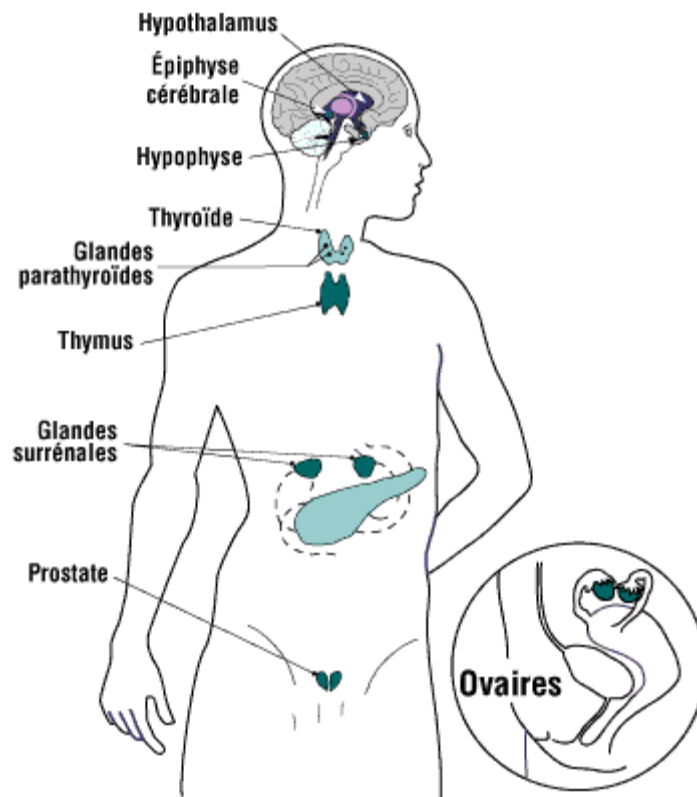
# CHAPITRE I : LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

## 1. GENERALITES

### 1.1. Le système endocrinien

Le système endocrinien est formé d'un ensemble d'organes et de récepteurs essentiels qui permettent le maintien de l'homéostasie par la régulation de nombreux processus physiologiques, tels que le métabolisme énergétique, la croissance, le sommeil ou encore les fonctions sexuelles. Les organes endocriniens, également appelés les glandes endocrines, vont intervenir dans cette régulation par la production et la sécrétion d'hormones qui pourront moduler les processus biologiques en atteignant des récepteurs situés dans des cellules cibles. Les différents organes composant le système endocrinien sont représentés dans la Figure 1.

Figure 1: Représentation schématique des organes endocriniens. Issu de [1].



Par exemple, l'hypothalamus, situé dans le système nerveux central, interagit avec différents organes par la production et la sécrétion de plusieurs hormones : l'hormone antidiurétique, l'ocytocine, la gonadolibérine, la thyrolibérine, la corticolibérine ou encore la somatocrine. Ainsi, un seul organe endocrinien peut réguler différents processus physiologiques essentiels au bon fonctionnement de l'organisme.

## 1.2. Les perturbateurs endocriniens

Bien que la notion de perturbateur endocrinien soit maintenant commune, elle n'est que relativement récente car introduite pour la première fois à la conférence de Wingspread en 1991. Il y fut affirmé que « *de nombreux composés introduits dans l'environnement par les activités humaines sont capables de perturber le système endocrinien des animaux, y compris les poissons, de la faune et des humains* » [2]. Cette affirmation, qui cite en premier lieu les animaux, repose sur de multiples observations reliant contamination environnementale et pathologies fauniques. Ainsi, dès 1947, une diminution de la population des Pygargues à tête blanche a été observée dans la région des grands lacs américains par des ornithologistes amateurs et professionnels. Ce n'est que plus tard qu'une relation entre cette diminution et la contamination des eaux par le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE) a pu être mise en évidence, démontrant ainsi l'impact des PE sur le développement de la faune [3]. Un autre exemple emblématique de cette relation est la féminisation des alligators du lac Apopka en Floride. Les biologistes ont observé chez ces animaux, et uniquement dans ce lac, des modifications importantes en hormones sexuelles (testostérone, 17 $\beta$ -estradiol) ainsi qu'une morphologie anormale des ovaires chez les femelles et une diminution de la taille des testicules et du phallus chez le mâle [4]. Ces altérations sont en lien avec des concentrations importantes en DDT et DDE retrouvées dans les œufs de ces alligators démontrant à nouveau la relation entre contamination environnementale et pathologies fauniques [5].

Depuis la conférence de Wingspread, la définition des PE a évolué. Ainsi, en 2002, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en a donné la définition suivante : « *Les perturbateurs endocriniens sont des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme qui peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrinien, et induire ainsi des effets délétères sur cet organisme ou ses descendants* » [6]. La différence principale avec la définition originelle étant l'ajout de la notion d'« effets néfastes » sur les organismes ou leurs descendants. Cette définition est actuellement toujours en vigueur.

Les PE peuvent être classés de différentes façons. Ainsi, en 2016, la Commission Européenne a proposé trois critères d'identification pour les PE [7]:

- Les PE « avérés » ;
- Les PE « présumés » ;
- Les PE « suspectés ».

Cette classification s'inscrit dans une volonté de la Commission Européenne d'adopter une « stratégie concernant les perturbateurs endocriniens ». Cette stratégie promeut un certain nombre d'actions à mener au niveau de l'Union Européenne et décrit les mesures à prendre à court, moyen et long terme [8]. Parmi ces actions figure le besoin de définir les critères permettant d'identifier les PE et leurs conséquences possibles sur la santé et l'environnement.

Si cette proposition de classification est récente, un inventaire européen réalisé en 2000 avait déjà permis d'établir une liste de 564 molécules ayant des effets modulateurs sur le système endocrinien. L'objectif de cet inventaire était de réaliser un état des lieux des substances suspectées d'effet PE afin de pouvoir cibler les investigations sur ces molécules. Parmi elles, 60 ont été classées en substances prioritaires en raison de leur effet PE avéré (catégorie 1), tandis que 51 étaient considérées comme potentiellement perturbatrices endocriniennes (catégorie 2) [9]. Une actualisation de cet inventaire en 2007 a porté ces chiffres à 194 et 125 respectivement [10]. Les PE peuvent être classés selon leur famille chimique et leur niveau de persistance. On distingue ainsi des PE persistants et à fort pouvoir d'accumulation et des PE moins persistants et avec un plus faible pouvoir d'accumulation (Tableau 1).

Tableau 1: Classification des perturbateurs endocriniens. Adapté de [11].

| Classification   | Exemple de PE   |
|--|---|
| <b>PE persistants avec bioaccumulation</b>                                   |   |
| Polluants organiques persistants   | PCDDs/PCDFs, PCBs, HCB, PFOS, PBDEs, PBBs, Chlordane, Mirex, Toxaphène, DDT/DDE, Lindane, Endosulfan  |
| Autres   | HBCDD, SCCP, PFCAs, Octachlorostyrène, PCB méthylsulfones   |
| <b>Substances chimiques moins persistantes et qui se bioaccumulent moins</b> |   |
| Plastifiants et autres additifs dans les matériaux et produits               | Phtalates esters (DEHP, BBP, DBP, DiNP), Triphényl phosphate, Bis(2-éthylhexyl)adipate, n-Butylbenzène, hydroxyanisole butylé   |
| Substances aromatique polycycliques  | Benzopyrène, Benzoanthracène, Pyrène, Anthracène  |
| Substances phénoliques halogénées  | 2,4-dichlorophénol, Pentachlorophénol, Hydroxy-PCBs, Hydroxy-PBDE, Tétrabromobisphénol A, 2,4,6-Tribromophénol, Triclosan   |
| Substances phénoliques non-halogénées  | Bisphénol A, Bisphénol F, Bisphénol S, Nonylphénol, Octylphénol, Résorcinol   |
| <b>Pesticides, résidus médicamenteux et parabènes</b>                        |   |
| Pesticides couramment utilisés   | 2,4-D-Atrazine, Carbaryl, Malathion, Mancozeb, Vinclozoline, Prochloraz, Procymidone, Chlorpyrifos, Fénitrothion, Linuron   |
| Résidus médicamenteux, facteurs de croissance, produits de soin corporel     | Diéthylstilbestrol, Ethinylestradiol, Tamoxifène, Lévonorgestrel, ISRS, Flutamide, 4-Méthylbenzylidène camphor, Octyl méthoxycinnamate, Parabènes, Cyclic méthyl siloxanes, Galaxolide, 3-benzylidène camphor |
| <b>Autres</b>  |   |
| Métaux et substances organométalliques                                       | Arsenic, Cadmium, Plomb, Mercure, Méthylmercure, Tributyltin, Triphényltn   |
| Hormones naturelles  | 17 $\beta$ estradiol, estrone, testostérone   |
| Phyto-œstrogènes   | Isoflavones, Coumestrol, Mycotoxines, Phénylflavonoïdes   |

*PCDDs polychlorodibenzodioxines, PCDFs polychlorodibenzofuranes, PCBs polychlorobiphényles, HCB hexachlorobenzène, PFOS acide perfluorooctanesulfonique, PBDEs polybromodiphényléthers, PBBs polybromobiphényles, DDT dichlorodiphényltrichloroéthane, DDE dichlorodiphényldichloroéthylène, HBCDD hexabromocyclododécane, SCCP paraffine à courte chaîne chlorée, PFCAs acides perfluorocarboxyliques, DEHP diethylhexylphthalate, BBP benzyl butyl phthalate, DBP dibutylphthalate, DiNP diisononyl phthalate, 2,4-D acide 2,4-dichlorophénoxyacétique.*

### 1.3. Sources et voies d'exposition aux perturbateurs endocriniens

Les PE étant très nombreux, les sources d'exposition le sont tout autant. L'ensemble des milieux auxquels sont exposés les humains sont potentiellement des sources de PE : air, eau, sol, alimentation, médicaments, dispositifs médicaux, produits ménagers, cosmétiques... [11]. Les sources d'exposition sont ainsi ubiquitaires et provoquent une exposition continue et à faibles doses de la population

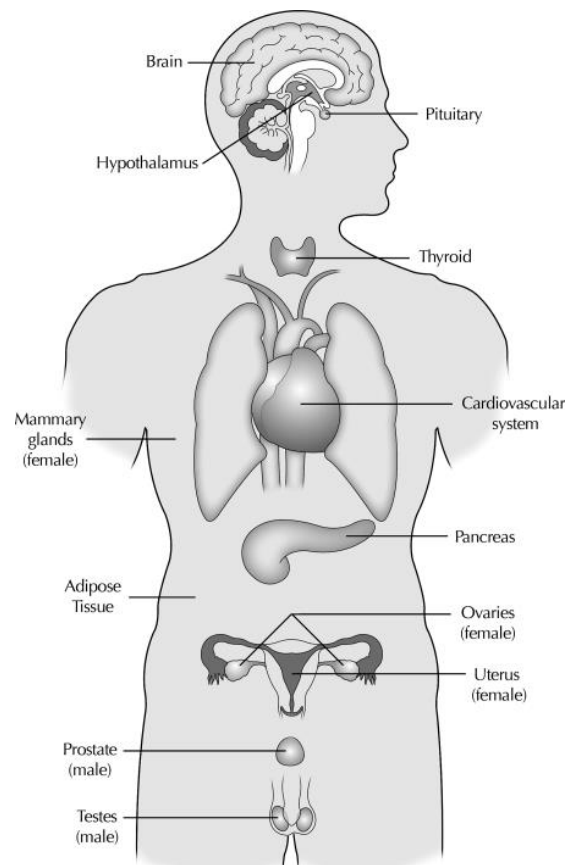
générale [12]. Cette exposition peut se faire par voie cutanée, par inhalation ou bien par ingestion. En fonction des caractéristiques physicochimiques du PE concerné, de sa pharmacocinétique et de ses sources d'exposition, l'exposition peut être variable.

#### 1.4. Mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens exercent une action sur toutes les fonctions physiologiques dont l'action est médiée par le système endocrinien, notamment le métabolisme, la fonction reproductrice, la croissance, le développement ou encore l'homéostasie [11]. Ces composés peuvent interférer avec « la production, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles responsables de la maintenance de l'homéostasie et la régulation des processus de développement » [13].

Les organes soumis au système endocrinien et pouvant donc être affectés par les perturbateurs endocriniens sont présentés dans la Figure 2.

Figure 2 : Organes pouvant être affectés par les perturbateurs endocriniens. Adapté de [14].



Pour exercer leurs effets, les PE doivent interagir avec des récepteurs endogènes. Ces interactions peuvent se faire :

- En mimant l'action d'une hormone naturelle par fixation sur un récepteur cellulaire, on parle alors de mécanisme agoniste ;
- En bloquant l'action d'une hormone naturelle, on parle alors de mécanisme antagoniste ;
- En modifiant la concentration d'hormones naturelles, en agissant sur leur synthèse, leur transport ou encore leur métabolisme ou leur excrétion.

Lorsqu'ils usent d'un mécanisme agoniste ou d'un mécanisme antagoniste, les PE interagissent donc directement avec des récepteurs qui peuvent être classés en deux types :

- Les récepteurs aux xénobiotiques dont la fonction principale est de médier l'action des systèmes enzymatiques permettant l'élimination de ces derniers. On peut citer l'exemple du récepteur intranucléaire PXR (pregnane X receptor) dont l'action peut être médiée par de nombreux xénobiotiques, à la fois de façon antagoniste (kétokonazole, metformine) ou de façon agoniste (ethinylestradiol, trans-nonachlor) [15–17] ;
- Les récepteurs aux ligands endogènes, tels que les récepteurs hormonaux, mais dont l'action peut être modulée par des xénobiotiques. On peut ainsi citer les récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$ ,  $\beta$ ) dont l'action peut être modulée par des perturbateurs endocriniens [18].

En agissant sur ces récepteurs, les PE peuvent ainsi avoir des effets :

- Génomiques, par action directe sur des récepteurs nucléaires, perturbant alors l'expression de gènes spécifiques en imitant l'action d'une hormone naturelle (effet agoniste) ou en empêchant l'émission d'un signal (effet antagoniste). C'est l'effet le plus fréquent ;
- Non génomiques, par action sur le transport des protéines, sur la production et la régulation des hormones ou de leurs récepteurs, conduisant ainsi à la modification des concentrations hormonales de l'organisme [11].

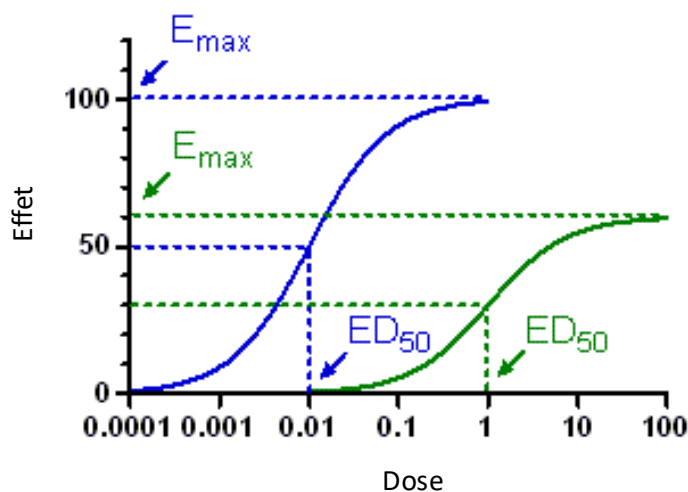
Au-delà de ces effets génomiques et non génomiques, les PE présentent des caractéristiques particulières rendant difficile l'exploration de leurs effets toxiques. Ces caractéristiques sont les suivantes :

- Effets à faible dose et relation dose-réponse non monotone ;
- Effets transgénérationnels ;
- Effets cocktails ;
- Effets d'une exposition *in utero* à des PE.

#### 1.4.1. Effets à faible dose et relation dose-réponse non monotone des perturbateurs endocriniens

La découverte et l'étude des PE ont remis en cause un des principes de la toxicologie établi par Paracelse, selon lequel : « Tout est mortel. Rien n'est mortel. C'est juste une question de quantité » [19]. Autrement dit, « la dose fait le poison ». Ce concept définit une augmentation de l'effet toxique d'un composé en fonction de la dose, donnant ainsi une courbe dose-réponse qualifiée de monotone (Figure 3).

Figure 3: Exemples de courbe dose-réponse monotone



En effet, les PE ne répondent pas à ce schéma classique de la toxicologie. On parle alors de relation dose-réponse non-monotone [19].

La notion de relation dose-réponse non-monotone est étroitement liée à la notion de faible dose qui a été définie en 2001 par un groupe de travail du National Toxicology Program (NTP) de la Federal Drug Agency (FDA). Les effets à faible dose d'une substance vont ainsi correspondre à tout changement biologique intervenant dans les conditions suivantes :

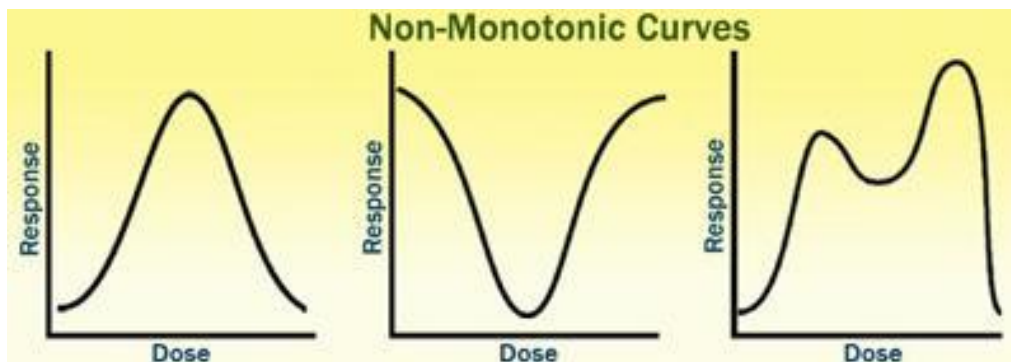
- Apparition de ces effets dans une gamme d'exposition humaine typique ;
- Apparition à des doses plus faibles que celles couramment utilisées dans les protocoles de test standards [20].

Une relation dose-réponse non-monotone, est basée sur la définition mathématique de la non monotonie. La courbe dose-réponse changera de signe, du positif vers le négatif ou l'inverse, en



fonction de la dose examinée. Cette relation non-monotone s'oppose aux relations monotones observées en toxicologie réglementaire, qui peuvent être linéaires ou non mais pour lesquelles on n'observe pas de changement de signe de la courbe dose-réponse [21]. Ainsi, les courbes dose-réponse des PE ont la plupart du temps une forme en cloche ou en U, on parle alors de courbe biphasique. Plus rarement, ces courbes peuvent être multiphasiques (Figure 4).

Figure 4 : Exemples de courbes dose-réponse non-monotones. A. En cloche; B. En U; C. Multiphasique. Issu de [22].



Ces relations non-monotones peuvent ainsi entraîner des effets agonistes à faibles doses et des effets antagonistes à dose plus importantes.

Comme évoqué et défini par le NTP, les perturbateurs endocriniens exercent leurs effets à faible dose. Cette notion de faible dose s'oppose à deux concepts de la toxicologie :

- La NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) qui correspond à la dose à partir de laquelle on n'observe pas d'effet nocif ;
- La LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) qui correspond à la dose la plus faible à partir de laquelle on observe aucun effet toxique [23]. La LOAEL est systématiquement plus grande que la NOAEL.

A partir de ces deux valeurs, la dose journalière admissible (DJA) peut être déterminée pour un composé. Elle correspond généralement à la NOAEL divisée d'un facteur 100.

Dans le cas des perturbateurs endocriniens, ces notions ne sont pas applicables car ceux-ci peuvent exercer leurs effets à des doses inférieures.

#### 1.4.2. Effets transgénérationnels

L'exposition aux PE peut entraîner l'apparition d'effets transgénérationnels. L'un des exemples le plus emblématique de cet effet délétère est l'utilisation du diéthylstilbestrol (DES), également connu sous le nom commercial de Distilbène®. Ce médicament prescrit jusqu'en 1977 en France, pour réduire le risque de fausses couches et d'accouchements spontanés chez les femmes enceintes, a montré des effets toxiques chez les enfants exposés *in utero*. Ainsi, dès 1970, la communauté médicale alertait sur le risque augmenté de développer un adénocarcinome du vagin chez les filles exposées *in utero* [24,25]. Le risque de développer un cancer du sein est également 2,3 fois plus important par rapport à la population non exposée [26]. Ces effets n'ont pas été démontrés chez les mères exposées au diéthylstilbestrol, soulignant ainsi que l'exposition *in utero* à des composés PE pouvait entraîner des effets à long terme chez l'enfant. Si cet effet perturbateur endocrinien peut s'expliquer par une exposition directe des enfants dont la mère recevait du DES, il a également été démontré une persistance d'un effet toxique chez les enfants issus de parents exposés *in utero* au DES et qui n'ont donc jamais été en contact direct avec cette molécule. Cela démontre la capacité d'effets transgénérationnels de certains perturbateurs endocriniens. Ainsi, une étude rétrospective a permis de mettre en évidence une augmentation du risque de dysgénésie testiculaire, pathologie associant cryptorchidie, hypospadias, hypospermie et cancer testiculaire. En effet, l'*odd-ratio* associé était de 5,72 pour la cryptorchidie et de 22,92 pour l'hypospadias [27]. Dans une autre étude, les auteurs ont retrouvé une forte prévalence d'hypospadias (8,2%) chez les petits-fils nés de mères exposées *in utero* alors que cette prévalence était nulle chez les enfants de mères non exposées [28].

A l'heure actuelle, il n'a pas été retrouvé de facteurs génétiques pouvant expliquer ce phénomène. Toutefois, cette transmission transgénérationnelle pourrait être expliquée par des causes épigénétiques. Cette hypothèse provient d'une étude menée chez la souris dans laquelle une modification phénotypique était induite non pas par une modification de la séquence d'ADN mais par une injection d'ARN [29]. L'épigénétique a été évoquée dès les années 1940 [30] et peut être définie comme tous les « facteurs ou processus moléculaires autour de l'ADN qui régulent l'activité génomique indépendamment de la séquence d'ADN » [31]. Différents mécanismes épigénétiques ont été identifiés tels que la méthylation de l'ADN, la modification des histones, la modification des chromatines ou encore les ARN non codants [32].

Les PE peuvent agir sur ces mécanismes, modifiant ainsi le taux de méthylation de l'ADN ou encore l'enroulement des histones, modifiant ainsi l'expression génomique sans modifier la séquence d'ADN. Par exemple, un modèle animal chez la souris a démontré que le diéthylstilbestrol pouvait entraîner une modification de la méthylation de l'ADN codant la région promotrice la lactoferrine [33]. Le

Bisphénol A (BPA) a également montré avoir une action sur la méthylation de l'ADN chez la souris [34] tandis que les phtalates ont également montré des effets transgénérationnels, toujours chez la souris [35].

### 1.4.3. Effets cocktails

La plupart des études cherchant à évaluer la toxicité des produits chimiques portent sur un composé étudié de façon isolée. Mais, si cette méthode permet d'évaluer les effets propres du composé, elle ne permet pas de prendre en compte de façon réaliste les effets d'une exposition chronique et simultanée à plusieurs composés, alors que certaines études de biomonitoring montrent que les populations sont exposées à plusieurs centaines de composés différents [36]. Différents composés peuvent provoquer entre eux des effets synergiques, additifs ou bien antagonistes, effets qui ne sont pas observables lors de l'étude isolée de chacun des composés. On parle alors d'effet cocktail [37].

Ces effets cocktails ont particulièrement été étudiés à l'aide de modèles animaux. Ainsi, en 2004, une étude a comparé les effets individuels de 7 composés ayant des effets oestrogéniques (nonylphenol, BPA, methoxychlor, genistein, estradiol, DES, ethinylestradiol) avec leurs effets produits en mélange, sur le poids d'utérus de rats. Cette étude a montré que les effets produits étaient différents selon que les composés étaient donnés de façon individuelle ou en mélange, avec une tendance à l'augmentation des effets dans le second cas. Les auteurs ont également démontré que les effets individuels ne pouvaient pas simplement être additionnés pour estimer les effets obtenus en mélange [38]. Une étude réalisée chez le poisson sur 5 composés oestrogéniques (17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, 4-tert-nonylphenol, 4-tert-octylphenol, BPA) a également démontré une potentialisation des effets PE de ces molécules administrées en mélange [39], à des doses pourtant inférieures aux NOAELs.

En 2007, une revue de la littérature a confirmé cette notion d'effet cocktail pour des mélanges de perturbateurs endocriniens, en présentant notamment des études portant sur le rat et poisson avec des mélanges de composés oestrogéniques, d'antagonistes androgéniques ou de perturbateurs de la fonction thyroïdienne [40]. Cette revue montre à nouveau des effets PE produits par ces mélanges à des doses inférieures aux NOAELs des composés pris individuellement. Son auteur propose notamment de faire évoluer les programmes de recherche en tenant compte de ces effets cocktail. Néanmoins, cela nécessite d'améliorer les études d'exposition en élargissant les composés recherchés afin d'affiner les mesures d'exposition totale [41].

A l'heure actuelle, les mécanismes participant à l'effet cocktail ne sont pas encore totalement connus. Toutefois, certains auteurs soulignent l'effet du récepteur aux xénobiotiques PXR dans ce mécanisme.

Selon une étude de 2015, l'éthinylestradiol et le trans-nonachlor ont la capacité de se lier à ce récepteur de façon coopérative, la liaison de l'un favorisant la liaison de l'autre. Cette association aboutit à la formation d'un ligand supramoléculaire entraînant des effets à des doses plus faibles par rapport aux mêmes composés pris individuellement [17].

Une étude sur lignée cellulaire a démontré que les mélanges de différents composés possiblement retrouvés en exposition humaine produisent un effet additif sur leurs propriétés antiandrogéniques. Parmi ces molécules étaient retrouvées le BPA, le méthylparabène, l'éthylparabène, le propylparabène ou encore le pirimiphos [42]. Une étude de 2017, menée cette fois-ci *ex vivo*, a étudié l'effet de mélanges de différentes molécules, dont le BPA, le BPS ou la chlordécone, sur la production de testostérone du tissu testiculaire fœtal. Les résultats ont montré que l'association des différents composés entraînait une diminution de la production de testostérone plus importante que pour les composés pris individuellement [43]. De la même façon, une étude de cohorte portant sur les données épidémiologiques du Maryland a montré une augmentation significative de développer un cancer en cas d'exposition au mélange nitrates/atrazine/metachlor, toujours en opposition aux composés pris individuellement [44].

#### 1.4.4. Effets de l'exposition *in utero* aux perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens peuvent passer la barrière placentaire et donc directement atteindre le fœtus durant la grossesse, avec un impact potentiel sur le développement durant la vie fœtale, la petite enfance et également avec des conséquences à long terme. Cette notion d'exposition *in utero* est directement reliée à l'hypothèse DOHAD (Developmental Origin of Health and Diseases). Cette hypothèse et ses origines étant détaillées dans le prochain chapitre, nous nous intéresserons ici uniquement à l'exposition prénatale, *in utero*, aux PE.

Différentes études ont mis en évidence le risque associé à l'exposition *in utero* aux PE. Ainsi, l'exposition prénatale aux phtalates a été associée à des troubles neurodéveloppementaux, notamment des troubles autistiques, des troubles du développement psychomoteurs ou encore une diminution du quotient intellectuel [45]. Dans la même étude, les auteurs ont également montré une association entre troubles du neurodéveloppement et exposition au BPA. On retrouve également des troubles du développement fœtal puisque l'exposition prénatale au BPA est associée à un petit poids de naissance et la prématurité [46,47]. Cette association entre diminution du poids de naissance et exposition *in utero* est également identifiée pour les polychlorobiphényles (PCBs) et le dichlorophényldichloroéthylène (DDE) [48] ou encore l'acide perfluorooctanesulfonate (PFOS) et

l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) [49]. Inversement, l'exposition à certains PE, tels que les parabènes, a été associée à une augmentation du poids de naissance [50]. Néanmoins, ces dernières données restent à confirmer au vu du manque d'études et de la complexité de l'étude d'une telle association [51]. Il a également été démontré une association entre l'âge gestationnel à la naissance et l'exposition *in utero* à certains PE. Ainsi, la benzophénone et le BPA réduisent la durée de la grossesse [52], tout comme certains composés perfluorés ou les organochlorés [53] ou encore le triclosan [54].

D'autres associations ont également été démontrées. Ainsi, l'exposition *in utero* au BPA et aux phtalates augmente le risque de développer de l'asthme et des allergies chez les enfants [55]. Les phtalates sont associés à des troubles du développement foetal avec notamment une diminution de la distance anogénitale [56,57]. C'est également le cas pour le triclosan [58]

Les troubles du développement associés à l'exposition prénatale peuvent être plus tardifs. Ainsi, l'exposition à la benzophénone et aux parabènes serait associée à des troubles du développement cognitifs chez les enfants de 2 ans [59], tandis que l'exposition au BPA est associée à un handicap social dès l'âge de 4 ans [60]. Ce lien est également retrouvé avec les phtalates [61].

De nombreuses autres pathologies sont associées à cette exposition *in utero*. Ainsi, un retard de puberté a été constaté avec le BPA et les phtalates [62] tandis que l'exposition aux pesticides organochlorés et organophosphorés est un facteur de risque d'hypospadias [63]. Enfin, cette exposition pourrait constituer un risque de développer une obésité [45,64]. Les cancers pourraient également être une conséquence de l'exposition *in utero* aux perturbateurs endocriniens [65,66].

## CHAPITRE 2 : ENJEUX DE L'EXPOSITION DES NOUVEAU-NES AUX PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

### 1. L'HYPOTHESE DOHAD

L'hypothèse DOHAD, pour *Developmental Origin of Health And Diseases*, établit que la période prénatale et les premiers jours de vie sont des phases critiques du développement de l'organisme au cours desquelles se développe une susceptibilité à diverses pathologies chroniques [67,68]. Selon ce concept, le développement précoce du fœtus et de l'enfant est particulièrement sensible à l'impact des facteurs nutritionnels et environnementaux, avec des conséquences déterminantes sur l'apparition de pathologies plus tard au cours de la vie [69]. Un des exemples les plus emblématiques de cette théorie est le diéthylstilbestrol (Distilbène®) déjà évoqué précédemment. En effet, si cette molécule montre des effets transgénérationnels certains, c'est en premier lieu sur des filles exposées *in utero* et donc de façon prénatale que ces effets PE ont pu être observés [25].

D'autres études viennent renforcer cette théorie. Ainsi, dès 1986, une étude anglaise a permis de mettre en évidence une corrélation entre la mortalité par ischémie cardiaque sur la période 1968-78 et la mortalité infantile en 1921-25 en Angleterre et au Pays de Galles. Les auteurs expliquent cette corrélation par la malnutrition durant l'enfance qui aurait eu un impact cardiovasculaire tardif [70]. Depuis, d'autres études sont venues appuyer cette théorie. Ainsi, plusieurs ont mis en évidence une relation entre le poids de naissance et le risque de développer une pathologie coronarienne à l'âge adulte. Plus le poids de naissance est faible, plus ce risque est important [71–73]. A l'inverse, un poids à la naissance supérieur à 4 kgs semble être associé à un risque de surpoids à l'adolescence [74].

Diverses pathologies sont aujourd'hui considérées comme ayant pour origine une exposition à des perturbateurs endocriniens à des périodes prénatales et durant la petite enfance. Par exemple, l'exposition prénatale au BPA ou au triclosan a été associée avec une modification du comportement chez de jeunes enfants [75]. Cette exposition prénatale au BPA a également été associée avec un faible poids de naissance [46,47], un risque élevé de prématurité [76,77] ou encore de l'asthme et des allergies [55].

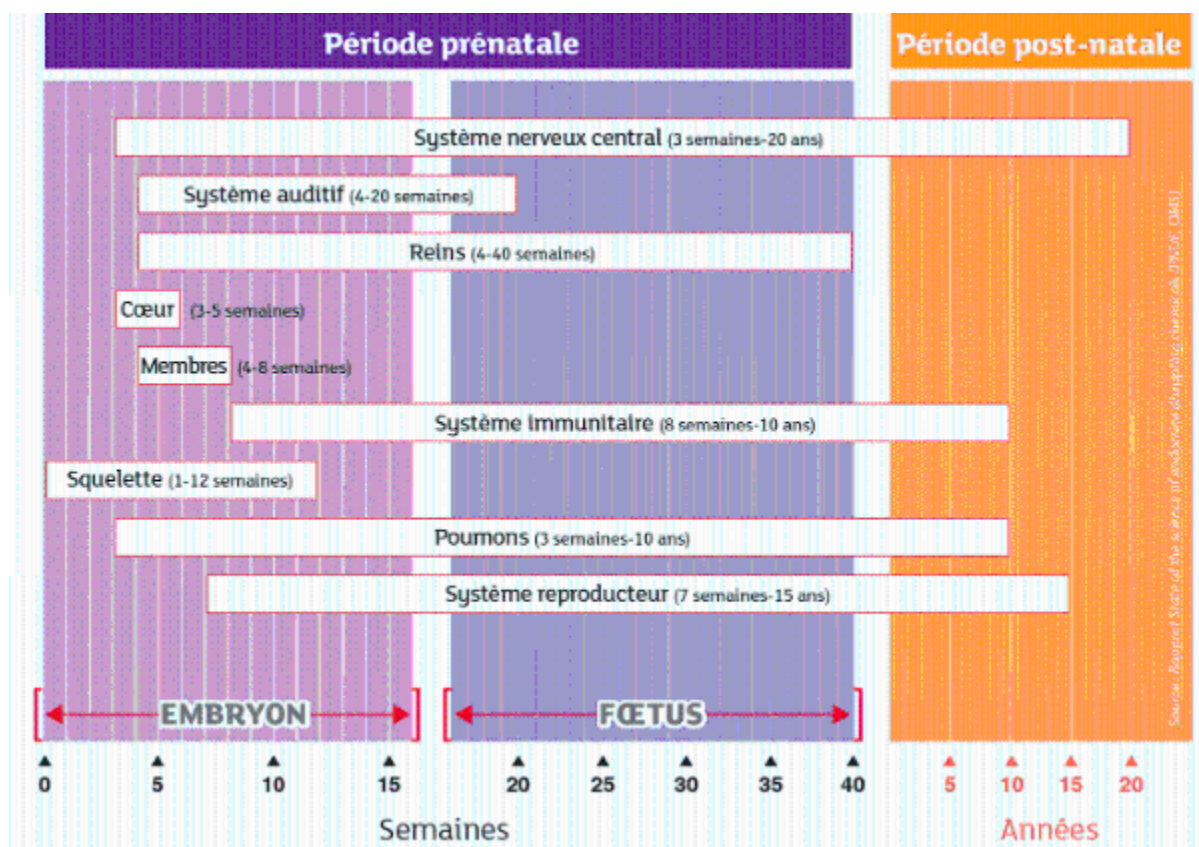
### 2. FENETRE D'EXPOSITION

Cette hypothèse DOHAD introduit donc une notion de fenêtre d'exposition durant laquelle la sensibilité aux facteurs environnementaux et nutritionnels, et donc les perturbateurs endocriniens, est

exacerbée. Les effets des PE auront des effets différents sur la santé des populations selon l'âge et l'état physiologique des individus exposés. On parle alors de « fenêtre d'exposition » ou encore de « périodes de vulnérabilité » [78]. La période *in utero* ainsi que les premières années de vie constituent ainsi des périodes particulièrement sensibles.

En effet, durant la période embryonnaire (de la fécondation jusqu'à la 15<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (SA)), les organes se forment selon le processus de l'organogénèse (Figure 5). Durant cette période, les risques tératogènes sont les plus importants [79]. La période foetale (de la 16<sup>ème</sup> semaine jusqu'à l'accouchement) constitue également une fenêtre d'exposition avec la poursuite de la croissance et de la maturation des organes. Une exposition sur cette période pourra provoquer des malformations foetales ou encore entraîner des effets retardés, toujours selon l'hypothèse DOHAD.

Figure 5 : Périodes de vulnérabilité aux perturbateurs endocriniens des principaux organes et systèmes chez l'homme. Issu de [78].



La période post-natale, donc chez le nouveau-né, est également considérée comme une période à risque pour l'exposition aux PE. En effets, certains organes et systèmes d'organes poursuivent leur

développement plusieurs années après la naissance. Le début de la période natale constitue une fenêtre de susceptibilité importante avec la poursuite du développement du système nerveux central et la mise en place et l'activation des mécanismes de rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadique [12]. Cette susceptibilité est d'autant plus vraie chez le nouveau-né prématuré dont le développement n'est pas allé à son terme. Par ailleurs, le système métabolique des nouveau-nés présente une immaturité à la naissance pouvant entraîner une surexposition à des composés PE par altération de leur métabolisme [80]. C'est notamment le cas des parabènes.

### **3. EXPOSITION DES NOUVEAU-NES AUX PERTURBATEURS ENDOCRINIENS**

#### **3.1. Via l'alimentation**

Les nouveau-nés, qu'ils soient hospitalisés ou non, peuvent être exposés à des perturbateurs endocriniens via de multiples sources. Une de ces sources est l'alimentation maternelle. Plusieurs études ont démontré l'exposition du nouveau-né à des composés toxiques via le lait maternel et cette matrice biologique est régulièrement utilisée pour évaluer l'exposition maternelle aux perturbateurs endocriniens [81]. Parmi les perturbateurs endocriniens, on retrouve dans le lait maternel des parabènes [82,83], des polychlorobiphényles (PCBs) et de l'hexachlorobenzène (HCB) [53] ou encore des phtalates, du BPA ou du triclosan [84]. Dans une étude menée en France, plus de 90% des échantillons de lait maternel, provenant de 86 mères, étaient contaminées avec des phtalates, du DDE et des PCB [85].

Un autre exemple de cette exposition via l'alimentation maternelle est celui de la chlordécone. Cet insecticide a été longtemps utilisé dans les Antilles françaises pour traiter les plants de bananes, entraînant une contamination durable des sols et de l'eau. Ce PE avéré a été retrouvé dans le lait maternel provoquant une exposition significative des nouveau-nés, avec un apport moyen de 0,03 µg/kg/j de chlordécone à 7 mois et 0,02 µg/kg/j à 18 mois [86]. Cette exposition via le lait maternel a été associée à une diminution de la taille et une augmentation de l'indice de masse corporelle chez les jeunes filles.

Ces perturbateurs endocriniens sont donc susceptibles d'exposer le nouveau-né par l'intermédiaire de l'alimentation maternelle. La sécrétion des PE dans le lait maternel peut varier selon des facteurs propres au composé (pKa, lipophilicité, poids moléculaire, ionisation) et des facteurs maternels (âge, statut physiologique, proportion de lipides dans le lait, tabagisme...) [81].



### 3.2. Via les produits de santé

Au-delà de l'alimentation maternelle, il existe d'autres sources possibles d'exposition aux PE chez les nouveau-nés. En effet, dans le cadre de leur prise en charge, les nouveau-nés hospitalisés sont susceptibles de recevoir des produits de santé, tels que les médicaments ou encore les dispositifs médicaux [87]. Par exemple, une étude française récente qui a étudié les médicaments reçus par plus de 27000 nouveau-nés hospitalisés, a montré que 261 médicaments différents étaient utilisés dans cette population et que 12 d'entre eux étaient retrouvés chez plus de 10% des patients [88]. Les dispositifs médicaux sont également couramment utilisés dans cette population, pour l'administration de médicaments, du monitoring ou encore de la ventilation. Ainsi, une étude menée sur 54 nouveau-nés prématurés hospitalisés en unité de soins intensifs a retrouvé chez la majorité d'entre eux du BPA, du méthyle et de l'éthylparabène, du triclosan et de la benzophénone dans leurs urines. BPA, méthyle et éthylparabène étaient les composés les plus fréquemment détectés avec des concentrations supérieures à celles retrouvées dans une cohorte adulte. Les auteurs font l'hypothèse que cette différence s'explique par l'usage de produits de santé plus important dans cette population [89].

Plusieurs dispositifs médicaux peuvent être impliqués dans cette exposition. Ainsi, une étude menée dans 2 services de soins intensifs en néonatalogie a démontré que l'usage de dispositifs médicaux contenant du diéthylphtalate (DEHP) était directement associé à une augmentation des taux urinaires de son métabolite, le mono(2-éthylhexyl)phtalate (MEHP) [90]. Les dispositifs médicaux impliqués dans cette exposition étaient ceux utilisés pour l'alimentation entérale, l'oxygénothérapie ou encore pour la voie parentérale. Ces mêmes dispositifs sont retrouvés dans une autre étude qui a recherché les dispositifs contenant des phtalates et utilisés dans les services de soins intensifs en néonatalogie [91]. Cette exposition est due à un relargage des phtalates depuis son contenant, le polychlorure de vinyle (PVC). Ce relargage est modulé par des facteurs tels que la température, la lipophilicité du produit contenu dans le PVC, le temps de contact, la surface de contact ou encore l'humidité [92,93]. Certains médicaments contiennent également des phtalates et leur utilisation a pu être associée à une diminution de la qualité du sperme chez l'homme [94] mais ils ne sont pas utilisés chez l'enfant. C'est dans cette optique que, dès 2008, la commission européenne, par l'intermédiaire du SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks) a proposé de limiter l'utilisation des dispositifs médicaux contenant des phtalates chez certaines populations considérées comme fragiles, notamment les nouveau-nés et les prématurés. Cette recommandation pointe également certains actes médicaux en lien direct avec les facteurs de relargage décrits [95].

Comme évoqué précédemment, les phtalates ne sont pas les seuls PE susceptibles d'être retrouvés dans les dispositifs médicaux, le bisphénol A est également un PE susceptible d'y être présent. Dans

une étude portant sur 6171 nouveau-nés de l'état de New-York aux Etats-Unis, les auteurs ont évalué les concentrations sanguines de 3 PE, dont le BPA. Leurs résultats montrent que ces nouveau-nés sont particulièrement exposés au BPA avec 90% des prélèvements présentant des concentrations supérieures à la limite de détection et une concentration plasmatique médiane de 7,88 ng/mL [96]. Si les auteurs n'ont pas investigué l'origine de cette exposition, d'autres études permettent de faire un lien entre dispositifs médicaux et exposition au BPA. Par exemple, l'usage chez un nouveau-né prématuré de plusieurs dispositifs médicaux est relié à une augmentation des concentrations urinaires en BPA [97]. Les nouveau-nés chez qui quatre dispositifs médicaux ou plus étaient utilisés avaient des concentrations urinaires en BPA 1,6 fois plus importantes par rapport aux autres nouveau-nés hospitalisés. Par ailleurs, ces concentrations urinaires sont plus importantes que celles retrouvées chez les nouveau-nés non hospitalisés et dans la population générale [98,99].

Pour limiter cette exposition, la nouvelle réglementation européenne 2017/745 qui doit entrer en vigueur en mai 2021, établit de nouvelles exigences de sécurité quant aux substances chimiques utilisées dans la fabrication des dispositifs médicaux [100]. Le paragraphe 10.4.1 précise que les substances possédant des propriétés perturbant le système endocrinien ne peuvent pas être présentes avec une concentration supérieure à 0,1% en fraction massique. Un taux si faible revient de fait à une interdiction des PE avérés dans les dispositifs médicaux, même si cette réglementation laisse la possibilité aux industriels de justifier leur présence dans certains cas.

Parmi les produits de santé, les médicaments sont également susceptibles d'être des sources d'exposition aux perturbateurs endocriniens. Nous ne discuterons pas dans cette thèse des potentiels effets perturbateurs endocriniens associés directement aux principes actifs, mais uniquement des PE pouvant être utilisés comme excipients. Ainsi, les 2 principaux excipients ayant des effets perturbateurs endocriniens et retrouvés dans les médicaments sont les phtalates et les parabènes. Si les médicaments contenant des phtalates ne sont pas susceptibles d'être utilisés chez les nouveau-nés, les parabènes le sont. En 2004, l'ANSM a établi une liste de 400 médicament contenant des parabènes, dont 306 plus particulièrement ciblés car contenant du propylparabène. L'exposition des nouveau-nés à ces médicaments sera détaillée dans le chapitre 3, partie 4.3.

### **3.3. Autres sources d'exposition**

L'alimentation et les produits de santé ne sont pas les seules sources d'exposition des nouveau-nés aux perturbateurs endocriniens. Les vêtements pour nouveau-nés constituent également une source d'exposition. Dans une étude portant sur 77 échantillons de textiles destinés à être utilisés dans cette

population, les auteurs rapportent que 82% et 53% des échantillons contiennent du BPA et du BPS respectivement, avec une moyenne de 366 ng de BPA par gramme de textile [101]. Les vêtements constitués de fibre synthétique étant 72 fois plus contaminés que ceux constitués uniquement de coton. A partir de ces données, les auteurs ont estimé l'exposition moyenne par voie dermique avec une exposition plus importante chez les nourrissons de moins d'un mois (248 pg/kg/j pour les nourrissons *versus* 201 pg/kg/j pour les enfants de 9 à 12 mois, pour le BPA). Des données similaires sont retrouvées dans une étude portant sur des chaussettes destinées aux nouveau-nés [102]. Plus de 90% des échantillons testés comportait du BPA, avec une concentration moyenne médiane de 20,5 ng/g. Dans la même étude, méthyle, éthyle et propylparabène ont également été retrouvés, avec des fréquences de détection de 81,2%, 100% et 43,7%, respectivement.

Les jouets peuvent également constituer des sources d'exposition aux perturbateurs endocriniens [103–106]. Divers PE sont retrouvés dans les jouets étudiés, dont du BPA, des phtalates ou encore des retardateurs de flamme. Ces études montrent également un relargage de ces composés PE vers la salive lorsqu'ils sont portés à la bouche, phénomène particulièrement présent chez le jeune enfant [107].

Enfin, une autre source d'exposition de cette population est formée par les produits d'hygiène corporelle. L'usage de ces produits chez les nouveau-nés est corrélé à une augmentation significative des concentrations urinaires de BPA ou des métabolites des phtalates par rapport aux nouveau-nés n'en recevant pas [108]. L'association entre utilisation de produits d'hygiène corporelle chez le nouveau-né et présence de métabolites des phtalates avait déjà été rapportée [109] tandis qu'une étude canadienne avait montré que 34% des produits d'hygiène corporelle à destination des nouveau-nés contenaient du di-éthyl-phtalate et un seul produit du DEHP [110].

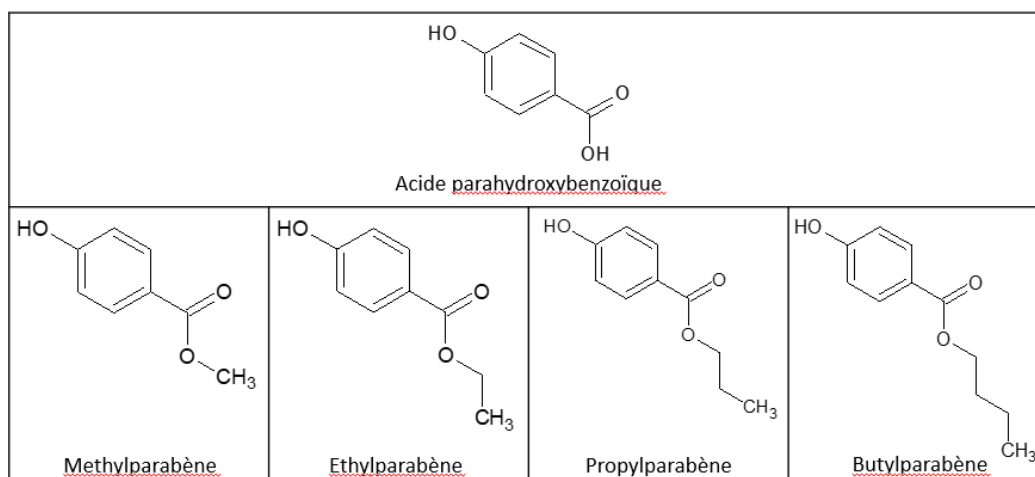
## CHAPITRE 3 : LES PARABENES

Dans cette partie, nous détaillerons les données scientifiques et toxicologiques existantes pour les 4 molécules ayant fait l'objet de nos travaux : le méthylparabène, l'éthylparabène, le propylparabène et le butylparabène.

### 1. STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES

Les parabènes sont des esters de l'acide parahydroxybenzoïque. Ils se différencient entre eux par la longueur et la structure de la chaîne alkyle greffée sur ce noyau parahydroxybenzoïque (Figure 6). Méthyle, éthyle, propyle et butylparabène sont les parabènes les plus utilisés. Il existe d'autres parabènes (isopropyle, isobutyle, phenyle, benzyle et pentylparabène) mais leur usage est interdit en Europe depuis 2014 [111].

Figure 6 : Structure chimique du méthyl-, éthyl-, propyl- et butylparabène et de l'acide parahydroxybenzoïque



Chacun des parabènes étudiés possède des caractéristiques physicochimiques propres présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2: Propriétés physicochimiques du méthyle, éthyle, propyle et butylparabène. Issu de [112–115].

| Nom            | CAS      | Masse molaire (g/mol) | Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/mL) | Coefficient de partage octanol/eau (Log Kow) | pKa  | Point de fusion (°C) | Point d'ébullition (°C) |
|----------------|----------|-----------------------|--------------------------------------|--|------|----------------------|-------------------------|
| Méthylparabène | 99-76-3  | 152,15                | 2500                                 | 1,96   | 8,17 | 131                  | 275                     |
| Ethylparabène  | 120-47-8 | 166,17                | 885                                  | 2,47   | 8,22 | 117                  | 297,5                   |
| Propylparabène | 94-13-3  | 180,21                | 500                                  | 3,04   | 8,35 | 97                   | 285                     |
| Butylparabène  | 94-26-8  | 194,23                | 207                                  | 3,57   | 8,37 | 68,5                 | 300                     |

A température ambiante, les parabènes se présentent sous la forme d'une poudre blanche cristalline inodore. La plupart de leurs propriétés physicochimiques sont liées à la longueur de la chaîne alkyle greffée sur le noyau para-hydroxybenzoïque. Pour les parabènes « à chaîne courte » (méthyle et éthylparabène), la solubilité dans l'eau est meilleure que pour les parabènes « à chaîne longue » (propyle et butylparabène). En revanche, le Log Kow augmente de façon proportionnelle à la longueur de la chaîne alkyle, indiquant un pouvoir de bioaccumulation fonction de la chaîne alkyle. Leur résistance à l'hydrolyse est également liée à la longueur de la chaîne alkyle, avec une augmentation de la résistance selon la longueur [116].

Les parabènes sont synthétisés depuis les années 1920. Leur synthèse est issue de l'estérification de l'acide para-hydroxybenzoïque (pHBA) avec un alcool, en présence d'un catalyseur (acide sulfurique concentré ou acide p-toluène sulfonique) [117].

## 2. TOXICOCINETIQUE

La toxicocinétique des parabènes chez l'homme restent peu décrite actuellement. Si elle est particulièrement étudiée dans les modèles animaux, il n'existe que peu de données évaluant les paramètres cinétiques humains des parabènes. De plus, l'extrapolation des données animales vers l'homme n'est pas satisfaisante en raison de la variabilité inter-espèce qui peut exister. Aussi, dans ce document, nous nous consacrerons autant que possible aux données existantes chez l'homme et à défaut, chez l'animal.

## 2.1. Absorption et distribution

### 2.1.1. Voie orale

Après une administration par voie orale, les parabènes sont rapidement et totalement absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal [118]. Les valeurs de biodisponibilité (F) des parabènes ne sont pas disponibles chez l'homme mais un modèle animal chez le rat a montré que leur biodisponibilité est importante et qu'elle est inversement proportionnelle à la longueur de la chaîne alkyle (F méthylparabène > F éthylparabène > F propylparabène > F butylparabène), sans toutefois en préciser les valeurs [119]. Une étude récente menée sur des volontaires sains, mais uniquement sur le propylparabène, confirme une absorption rapide avec une bonne biodisponibilité (F = 0,39) [120].

### 2.1.2. Voie cutanée

L'absorption des parabènes par voie cutanée a été beaucoup plus étudiée comparativement à la voie orale. Ils sont correctement absorbés par la peau puis hydrolysés en pHBA par les carboxylestérases cutanées hCE1 et hCE2. Cette hydrolyse est partielle et est sujette à une variabilité inter-individuelle [121].

Différents facteurs ont une influence sur le passage transcutané des parabènes. Ainsi, malgré sa faible lipophilicité, le méthylparabène est le parabène présentant le meilleur passage de la barrière cutanée [122]. L'absorption des parabènes est d'autant plus grande que la chaîne aliphatique est courte. Après une application cutanée, près de 85% et 81% du méthyle et du butylparabène sont absorbés et respectivement 35% et 33% sont métabolisés en pHBA par les carboxylestérases avant de passer dans la circulation systémique. Au niveau du tissu adipeux sous-cutané, la carboxylestérase hCE1 est la plus représentée. Elle possède une activité préférentielle pour le méthylparabène. Ici aussi, l'affinité est inversement proportionnelle à la longueur de la chaîne aliphatique (méthyl > éthyl > propyl > butyl). En revanche, pour la carboxylestérase hCE2, cette affinité est proportionnelle (méthyl < éthyl < propyl < butyl). L'application répétée de parabènes au niveau cutané provoque un phénomène d'accumulation au niveau du *stratum corneum*. Dans une étude sur volontaire sain, l'application d'une formulation de méthylparabène à 0,15% deux fois par jour pendant 4 semaines provoquait une augmentation d'un facteur 12 de la concentration en méthylparabène [123].

Le passage transcutané des parabènes vers la circulation systémique a été caractérisé dans une étude de 2007. Vingt-six volontaires sains y ont reçu quotidiennement une application d'une formulation contenant du butylparabène. La détection de ce composé était effective 1 heure après l'application,

avec une concentration maximale à 3h. Le pic de concentration urinaire était atteint entre 8 et 12 heures après l'application [124].

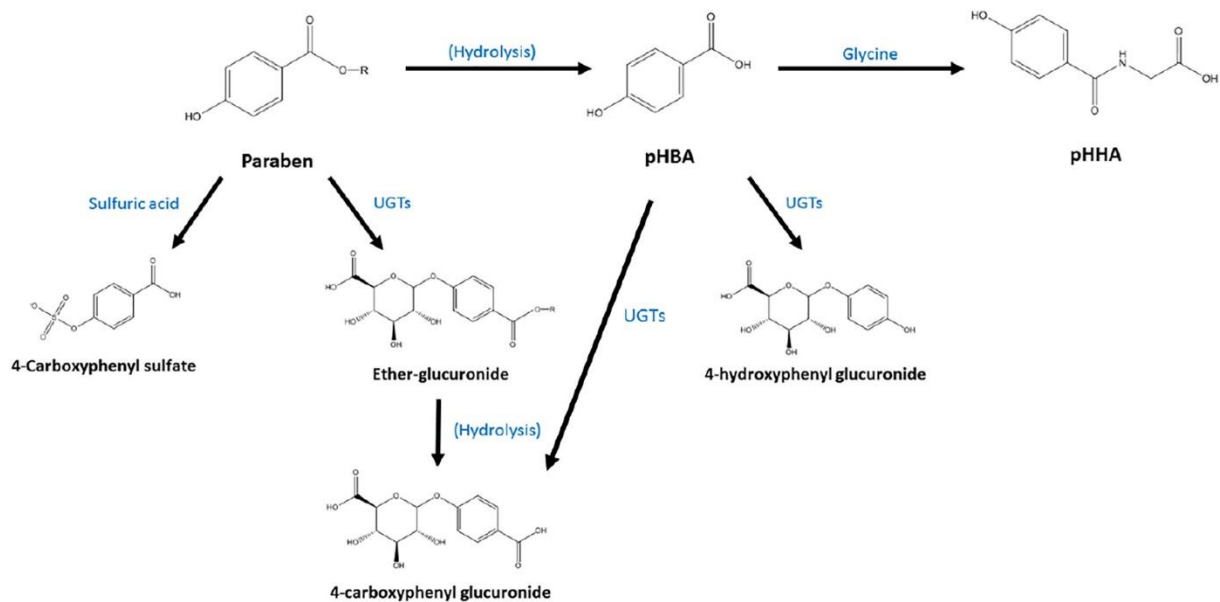
Enfin, il a été montré que l'utilisation concomitante d'alcool lors d'une application cutanée potentialise le passage transcutané des parabènes, l'alcool étant parfois utilisé comme agent perméabilisant dans les formulations galéniques [125]. De plus, cela entraîne une réaction de transestérification pouvant aboutir à la formation de butylparabène à partir du méthylparabène [126].

## **2.2. Métabolisme**

Les données de métabolisme des parabènes chez l'homme sont peu nombreuses. Après absorption, les parabènes sont rapidement métabolisés par 3 voies majoritaires. La voie de l'hydrolyse aboutit à la formation d'acide para-hydroxybenzoïque (pHBA) puis d'acide para-hydroxyhippurique (pHHA), tandis que les voies de sulfonation et de glucuronidation entraînent la formation de conjugués sulfate ou glucuronide, respectivement [118,127]. L'intervention de la voie de l'hydrolyse entraîne un métabolisme différent des parabènes en fonction de la voie d'exposition, en raison de la présence d'estérases cutanées au niveau de la peau [118]. Le pHBA et le PHHA sont des composés communs au métabolisme de tous les parabènes mais sans être spécifiques du métabolisme de ces composés.

Une étude pharmacocinétique, menée sur des adultes sains, a montré qu'après une prise orale, les concentrations plasmatiques en propylparabène suivaient un modèle bicompartmental composé d'une diminution rapide des concentrations sur une heure, puis d'une seconde phase de diminution de 6h [120]. Les métabolites conjugués ainsi que le pHBA et le pHHA étaient rapidement détectés après la prise orale. Plus aucun composé, parent ou métabolite, n'était détecté dans le compartiment sanguin après 48 heures. D'après cette étude, la voie de l'hydrolyse serait majoritaire sur les voies de conjugaison. Néanmoins, la proportion de chacune des voies de métabolisme reste mal connue et pourrait varier selon la longueur de la chaîne alkyle du parabène [128]. Un schéma descriptif de la connaissance actuelle du métabolisme des parabènes est présenté en Figure 7.

Figure 7: Voies de métabolisme des parabènes. Issu de [120]



### 2.3. Elimination

Les parabènes sont éliminés au niveau des urines, majoritairement sous la forme pHBA/pHHA ou sous leur forme conjuguée. La fraction de composé parent retrouvé au niveau urinaire est minime [120,128].

Les données obtenues sur volontaires sains après ingestion de composés deutérés de méthyle, iso-butyle et n-butylparabène ont montré que plus de 80% de la dose ingérée était retrouvée dans les urines dans les premières 24h, et jusqu'à 86% dans les 48 heures [128]. Le principal métabolite retrouvé était le pHHA, le pHBA ne représentant qu'une faible part de l'excrétion (3 à 7,2% de la dose ingérée). Le principal métabolite conjugué retrouvée était le glucuronide tandis que la forme parente était minoritaire.

Une deuxième étude menée chez l'homme et portant cette fois-ci sur le propylparabène a montré que seulement 39% de la dose totale ingérée était retrouvée dans les urines, ce qui est bien inférieur à ce qui a été retrouvé dans la précédente étude [120]. Néanmoins, ici aussi, les métabolites majoritaires étaient le pHHA et les métabolites conjugués mais dans des proportions différentes. Cette différence pouvant être due à l'utilisation d'une technique de déconjugaison dans les 2 études, pour le dosage des métabolites conjugués. Or ces méthodes sont connues pour leur manque de fiabilité [129]. Globalement, la demi-vie d'élimination de ces composés est rapide et augmente avec la longueur de la chaîne alkyle.



### 3. EFFETS PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Les parabènes sont reconnus comme des perturbateurs endocriniens et leur principal mécanisme d'action est oestrogénique, par liaison aux récepteurs  $Er\alpha$  et  $Er\beta$ . Cette capacité de liaison a été démontrée *in vitro* sur des cultures de cellules humaines MCF-7 [130,131]. L'activité oestrogénique de ces composés est directement reliée à la longueur de la chaîne aliphatique greffée sur le noyau parahydroxybenzoïque. Par rapport au ligand de référence des récepteurs  $Er\alpha$  et  $Er\beta$ , le  $17\beta$ -œstradiol, la capacité de liaison a été évaluée comme 2500000, 150000, 30000 et 10000 fois inférieures pour le méthyle, l'éthyle, le propyle et le butylparabène, respectivement [132].

Chez l'animal, l'exposition de rats au méthyle, éthyle, propyle et butylparabène a été associée à une augmentation de la taille des glandes surrénales et une diminution de la thyroïde [133]. Chez le rat mâle, l'exposition au propylparabène entraîne une altération de la qualité de la spermatogénèse ainsi qu'une diminution de la concentration plasmatique en testostérone [134]. L'exposition *in utero* au butylparabène est associée à une diminution de la masse des organes reproducteurs ainsi qu'à des changements dans la morphologie de la prostate et des testicules [135,136].

Chez le rat femelle, l'exposition au méthyle, éthyle, propyle et butylparabène est associée à une augmentation de la masse des ovaires et une modification de leur structure histologique [133] tandis que l'exposition au propyle et au butylparabène est associée à une augmentation de la masse de l'utérus [137].

Un résumé des effets perturbateurs endocriniens des parabènes chez l'animal est présenté dans le Tableau 3.

Tableau 3: Effets perturbateurs endocriniens des parabènes chez l'animal. Adapté de [138].

| <b>Parabène</b>                         | <b>Effets perturbateurs endocriniens associés</b>  |
|---|--|
| <b>BuPb</b>                             | Diminution de l'expression des ARNm du récepteurs aux benzodiazépines et de la protéine de régulation aiguë stéroïdogène   |
| <b>BuPb</b>                             | Augmentation de la concentration en 17 $\beta$ -estradiol<br>Augmentation de la concentration en progestérone<br>Diminution du poids des testicules et des ovaires   |
| <b>BuPb</b>                             | Diminution de la qualité du sperme   |
| <b>BuPb</b>                             | Diminution de la masse des organes reproducteurs   |
| <b>PrPb, BuPb</b>                       | Augmentation de la concentration en estradiol  |
| <b>MePb</b>                             | Augmentation des concentrations en leptine   |
| <b>MePb, BuPb</b>                       | Diminution des concentrations en propeptide N-terminal du procollagène de type I   |
| <b>BuPb</b>                             | Diminution de la concentration en cortisol   |
| <b>Iso-PrPb, BuPb</b>                   | Augmentation du poids de l'utérus  |
| <b>PrPb, BuPb</b>                       | Diminution de la réserve en sperme dans l'épididyme  |
| <b>MePb, EtPb, PrPb, iso-PrPb, BuPb</b> | Diminution de la concentration en thyroxine<br>Diminution du poids de la glande thyroïde<br>Augmentation du poids des ovaires<br>Augmentation du poids des glandes surrénales  |
| <b>BuPb</b>                             | Diminution de la concentration en testostérone   |
| <b>BuPb</b>                             | Augmentation de l'expression des gènes des récepteurs à la progestérone,   |
| <b>BuPb</b>                             | Diminution de l'expression du gène CYP19A1   |
| <b>BuPb</b>                             | Augmentation du nombre de cellules de Leydig<br>Augmentation de la concentration en testostérone<br>Diminution de la concentration en hormone lutéinisante<br>Diminution de la concentration de l'hormone folliculo-stimulante |
| <b>PrPb, iso-PrPb, BuPb, iso-BuPb</b>   | Augmentation de l'expression des ARNm de la Calbindine-D9k<br>Augmentation de l'expression des ARNm des récepteurs à la progestérone   |

*MePb* : méthylparabène ; *PrPb* : propylparabène ; *BuPb* : butylparabène ; *iso-PrPb* : isopropylparabène ; *iso-BuPb* : isobutylparabène

Les cibles d'actions des parabènes sont multiples. Ils peuvent agir à la fois comme agonistes des récepteurs aux œstrogènes, mais également comme des antagonistes des récepteurs aux androgènes ou comme des inhibiteurs des sulfotransférases [121].

Chez l'homme, les parabènes, sous leur forme parent, ont été retrouvés dans des échantillons de tissus issus de cancers du sein [139]. Si ces premières données ne permettaient pas d'établir un lien clinique certain en raison des limites de l'étude, elles ont porté l'attention sur les effets des parabènes chez

l'homme. Ainsi, dans une étude récente, il a été retrouvé un lien significatif entre exposition au méthyle et au propylparabène contenus dans les produits d'hygiène corporelle et puberté précoce chez les jeunes filles [140].

#### **4. UTILISATION ET PRESENCE DANS L'ENVIRONNEMENT**

Les parabènes sont couramment utilisés, pour leur propriétés antibactériennes et antifongiques, comme conservateurs dans les produits cosmétiques, les aliments et les médicaments depuis le début du XX<sup>e</sup> siècle. De par la synergie de leurs effets antibactériens et antifongiques, ils sont le plus souvent utilisés en association [141]. En effet, si leurs propriétés conservatrices augmentent avec la longueur de leur chaîne aliphatique, leur solubilité diminue en suivant le même critère [132]. Leur association permet donc d'obtenir des effets antibactériennes et antifongiques en limitant leurs concentrations dans les produits finis.

De plus, ces composés possèdent des propriétés organoleptiques satisfaisantes, un faible coût de production, une excellente stabilité ainsi qu'une bonne inertie chimique. L'ensemble de ces éléments font des parabènes des conservateurs de choix pour les industriels [142]. Selon les données de l'INERIS, la production de parabènes atteint 10000 tonnes et 1000 tonnes par an, respectivement pour l'éthyle et le propylparabène [143].

Les sources principales d'exposition à ces composés sont l'alimentation, les cosmétiques et les produits de santé.

##### **4.1. Présence dans l'alimentation**

Certains parabènes, comme le méthyle ou le propylparabène, sont retrouvés à l'état naturel et à de faibles concentrations dans certains fruits (myrtilles, mûres, fraises), légumes (carottes) et céréales [144–146]. Les parabènes sont également présents de façon artificielle dans les produits alimentaires. Ils sont alors identifiables sur les emballages par leur numéro issu de la directive européenne 95/2/CE :

- Méthylparabène : E218 (E219 pour son sel sodique) ;
- Ethylparabène : E214 (E215 pour son sel sodique) ;
- Propylparabène : E216 (E217 pour son sel sodique) ;

En Europe, seuls le méthyle et l'éthylparabène sont autorisés en tant qu'additifs alimentaires alors que le propylparabène a été exclu des produits autorisés en 2006 [147,148]. La directive 2006/52/CE

précise même qu'il est nécessaire d'interdire l'utilisation des parabènes dans les compléments alimentaires liquides. Deux ans auparavant, l'EFSA (European Food Safety Authority) avait défini une dose journalière admissible de 10 mg/kg pour la somme des différents parabènes [149].

Aux Etats-Unis, le propylparabène reste autorisé et les parabènes dans leur ensemble sont considérés comme sûrs. Ils ne doivent toutefois pas dépasser une teneur de 0,1% dans les produits alimentaires [150].

#### **4.2. Présence dans les cosmétiques et les produits d'hygiène corporelle**

Les cosmétiques constituent la principale utilisation des parabènes en tant que conservateurs. On les retrouve dans divers produits tels que les shampoings, le maquillage, les démaquillants, les crèmes, les lotions, les crèmes solaires ou encore les déodorants [142].

Une étude, portant sur 170 produits d'hygiène corporelle utilisés aux Etats-Unis, a montré que 58% d'entre eux contenaient au moins un parabène et que la plupart contenait une association de plusieurs parabènes. Vingt produits d'hygiène corporelle testés étaient destinés à un usage chez le nouveau-né ; parmi eux, 60% contenaient au moins un parabène [151].

Dès 2009, la Commission Européenne a régulé la présence des parabènes dans les cosmétiques en interdisant les teneurs supérieures à 0,4% pour les produits utilisés seuls ou supérieures à 0,8% pour les produits utilisés en association. Cette limitation concerne l'acide 4-hydroxybenzoïque, ses sels et ses esters [152]. Par la suite, elle a également interdit l'utilisation des parabènes suivants dans les cosmétiques : isopropylparabène, isobutylparabène, phenylparabène, benzylparabène, pentylparabène [111].

#### **4.3. Présence dans les médicaments**

Il n'existe pas d'études publiées rapportant la proportion de médicaments contenant des parabènes. Toutefois, les autorités sanitaires nationales et européennes se sont intéressées à cette problématique. Ainsi, dès 2004, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) a commencé à recenser l'ensemble des spécialités pharmaceutiques contenant des parabènes. Elle a identifié 400 spécialités contenant des parabènes dont 306 plus particulièrement ciblés car contenant du propylparabène, suspecté de présenter un risque pour la fertilité. Parmi ces médicaments, l'agence a ciblé les produits les plus à risque en termes de dose ainsi que ceux destinés à la population pédiatrique considérée comme population particulièrement à risque [153]. Depuis,

l'ANSM n'a pas émis de nouvelles recommandations concernant les médicaments contenant des parabènes.

Au niveau européen, l'European Medicine Agency (EMA) a également entamé une série de réflexions sur l'utilisation du méthyle et du propylparabène dans les médicaments utilisés par voie orale [154]. A l'heure actuelle, elle considère que les preuves cliniques concernant les effets des parabènes sont insuffisantes, tout en soulignant le risque plus grand pour la population pédiatrique. L'EMA recommande que l'utilisation de parabènes comme conservateurs dans un médicament nécessite une justification toute particulière et que l'utilisation de ces substances soit évitée, en particulier en cas de formulation pédiatrique. Enfin, elle recommande également d'utiliser la concentration la plus basse possible. De même, en l'absence de consensus sur les effets des parabènes sur la santé, l'Académie Nationale de Pharmacie a émis des recommandations notamment pour limiter l'utilisation des parabènes dans les médicaments destinés à la population pédiatrique [155].

La présence des parabènes dans les spécialités pharmaceutiques est une problématique mondiale. Ainsi, une étude américaine a montré que sur 128 médicaments testés provenant essentiellement des Etats-Unis mais également d'Italie, de Pologne, d'Espagne, de Chine, d'Inde et du Japon, 20% contenaient des parabènes [156]. La proportion de médicaments contenant des parabènes était plus importante pour les formes galéniques liquides (44%) que pour les formes galéniques solides (10%). Dans une étude portant sur 100 médicaments commercialisés en Chine, les auteurs ont retrouvé que 97% de ces spécialités comportaient au moins un parabène, le méthylparabène étant le composé le plus fréquemment retrouvé [157]. Parmi les spécialités testées, 25 étaient susceptibles d'être utilisées chez l'enfant et 95% d'entre elles comportaient au moins un parabène. Les auteurs ont estimé que l'utilisation de ces médicaments chez l'enfant entraînait un apport moyen de 10,1 ng/kg par jour, soit environ 2 fois plus que les apports estimés pour l'adulte.

## **5. EXPOSITION DES NOUVEAU-NES AUX PARABENES VIA LES MEDICAMENTS**

A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées à l'exposition des nouveau-nés aux parabènes via leur administration par les médicaments. La plupart se focalisant sur les excipients à effet notoire dans leur ensemble et non uniquement sur les parabènes. Une étude prospective menée en Estonie a montré que sur 348 enfants, la quasi-totalité (343) avait reçu au moins une fois un médicament contenant des parabènes [158]. Des études similaires, menées au Brésil et en Espagne, ont montré des résultats similaires, avec une prescription très fréquente de médicaments contenant des parabènes

chez les nouveau-nés hospitalisés [159,160]. De plus, ces études ont montré que les prescriptions de médicaments contenant des parabènes étaient plus fréquentes chez les nouveau-nés prématurés.

Une étude plus large, réalisée dans 81 services de néonatalogie de 21 pays européens, a cherché à évaluer la prévalence de l'exposition des nouveau-nés aux médicaments contenant des excipients à effet notoire durant leur hospitalisation [161]. Les auteurs ont ainsi relevé que 19% des prescriptions comportaient des médicaments contenant des parabènes et que 43% des nouveau-nés étaient exposés au moins une fois aux parabènes via les médicaments administrés durant leur hospitalisation. Comme dans les trois études précédentes, la proportion de nouveau-nés exposés augmente avec le niveau de prématurité. Ainsi, 55% des très grands prématurés étaient exposés contre seulement 35% chez les nouveau-nés à terme.

Une seule étude a estimé la quantité de parabènes reçus par des nouveau-nés hospitalisés via l'administration de médicaments [162]. Dans cette étude, qui a porté uniquement sur le méthyle et le propylparabène, les auteurs ont recueilli les prescriptions de 181 nouveau-nés hospitalisés, nés à terme ou prématurément. Chaque enfant avait reçu en moyenne 32,5 et 20,3 doses de méthyle et propylparabène respectivement, majoritairement par voie orale. La moyenne de la durée d'administration des médicaments contenant des parabènes était de 14 jours, avec des doses journalières moyennes de 0,58 mg/kg pour le méthylparabène et 0,14 mg/kg pour le propylparabène. Si cette étude est la seule ayant quantifié l'exposition des nouveau-nés aux parabènes via l'administration des médicaments, elle a également mesuré les concentrations sanguines en parabènes dans cette population. Les concentrations médianes de méthylparabène mesurées dans le sang des nouveau-nés (âge gestationnel médian de 222 jours) étaient de 13,0 ng/mL soit près de 10 fois plus élevés que les taux mesurés dans le plasma d'adultes sains (1,57 ng/mL) dans une étude danoise [163]. Le propylparabène a quant à lui été retrouvé à des concentrations supérieures à 10 ng/mL dans plus de 25% des prélèvements réalisés chez ces nouveau-nés alors que la concentration médiane retrouvée chez l'adulte sain était de 0,32 ng/mL. Ces résultats montrent le risque de surexposition aux parabènes des nouveau-nés hospitalisés. Par ailleurs, les taux sanguins retrouvés chez ces nouveau-nés hospitalisés recevant des médicaments contenant des parabènes sont bien supérieurs à ceux mesurés à l'accouchement dans le sang de cordon des nouveau-nés (environ 2,2 ng/ml et 0,3 ng/ml en médiane, pour le méthyle et le propylparabène respectivement), suggérant un impact non négligeable des médicaments contenant des parabènes sur le niveau d'exposition des nouveau-nés à ces PE [164].

## **DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS**

## OBJECTIFS DE LA THESE

Dans la première partie de cette thèse, nous avons vu que l'exposition des nouveau-nés aux perturbateurs endocriniens pouvait avoir une incidence directe sur le développement de pathologies à long terme. Les nouveau-nés peuvent être exposés à de multiples PE, notamment les parabènes. Ces derniers sont notamment utilisés dans les médicaments en tant que conservateurs. Les nouveau-nés hospitalisés après leur naissance sont particulièrement à risque de recevoir des médicaments pour traiter certaines de leurs pathologies, et plus particulièrement les nouveau-nés prématurés, et ainsi être exposés aux parabènes via cette source. Peu de données de la littérature décrivent actuellement l'exposition des nouveau-nés aux parabènes et elles n'offrent pas les éléments pour faire évoluer les stratégies de prise en charge et limiter ainsi cette exposition. Il est donc nécessaire de pouvoir caractériser cette exposition, à la fois en termes de fréquence et de quantité, à travers l'exploration des pratiques de prise en charge des nouveau-nés, plus particulièrement les prématurés.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer la prévalence de l'exposition des nouveau-nés hospitalisés aux parabènes via l'administration des médicaments, de quantifier cette exposition et de proposer des alternatives de prise en charge afin de limiter leur exposition à ces PE.

Pour répondre à cet objectif, nos travaux se décomposent en trois parties :

- Le premier volet, épidémiologique, a consisté à explorer l'exposition des nouveau-nés aux parabènes contenus dans les médicaments utilisés lors de l'hospitalisation faisant suite à leur naissance. Cette exploration s'est faite en deux temps. Une première étude préliminaire sur un nombre limité de patients, a permis de mettre en évidence que les médicaments sont des sources d'exposition aux parabènes et d'identifier les points essentiels et les limites à prendre en compte pour mener une étude à plus grande échelle. La deuxième étude, menée sur une cohorte couvrant une partie importante du territoire français, prospective et multicentrique, a permis de caractériser avec précision cette exposition.
- Le deuxième volet, analytique, a consisté à développer une méthode de dosage plasmatique ultrasensible des parabènes, afin de pouvoir identifier la part attribuable aux médicaments dans l'exposition des nouveau-nés aux parabènes.
- Le troisième volet a consisté à identifier les stratégies de prise en charge afin de limiter l'exposition aux parabènes via les médicaments. Des préparations pharmaceutiques sans parabènes ont été développées et des alternatives ont été explorées via l'étude des prescriptions obtenues durant l'étude multicentrique.



# **CHAPITRE 1 : EXPOSITION DES NOUVEAU-NES PREMATURES AUX PARABENES VIA L'ADMINISTRATION DES MEDICAMENTS**

La littérature scientifique concernant l'exposition des nouveau-nés hospitalisés, nés à terme ou prématurés, aux parabènes via l'administration des médicaments, est rare. Aucune étude ne permet d'établir avec précision les niveaux de cette exposition ainsi que ses déterminants. Ces éléments sont pourtant indispensables afin de pouvoir proposer des solutions de prévention et d'intervention afin de limiter l'exposition aux parabènes des nouveau-nés hospitalisés.

C'est dans ce contexte que notre équipe a choisi de d'étudier les prescriptions de médicaments afin de déterminer avec précision les doses d'exposition des nouveau-nés aux parabènes via les médicaments, leurs prévalences ainsi que leurs déterminants. C'est le premier volet de cette thèse, qui pour objectif d'explorer de façon prospective et multicentrique l'exposition des nouveau-nés aux parabènes via l'administration des médicaments.

Dans un premier temps, nous avons choisi de réaliser une étude préliminaire afin d'identifier les éléments pertinents pour cette étude. Dans un second temps, sur les bases des données recueillies dans l'étude préliminaire, nous avons mené une étude à large échelle sur l'exposition des nouveau-nés aux parabènes via l'administration des médicaments.

## **ETUDE PRELIMINAIRE**

### **1. INTRODUCTION**

Ces dernières années, l'incidence des maladies chroniques et notamment des pathologies endocriniennes a progressé de façon importante en France comme au niveau mondial. L'OMS parle même d'une épidémie mondiale [165]. Une des hypothèses avancées se fonde sur l'origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD) selon laquelle la période prénatale et les premières années de vie sont des phases critiques où s'établit une susceptibilité à diverses pathologies chroniques [67,68]. D'après ce concept, le développement précoce du fœtus et de l'enfant (in utero et durant les premières années de la vie postnatale) serait particulièrement sensible à l'impact des facteurs nutritionnels et environnementaux (chimiques, infectieux) avec des conséquences déterminantes sur l'apparition ultérieure de pathologies (développement de cancers, obésité, maladies métaboliques...) [69].

Parmi les facteurs environnementaux, les perturbateurs endocriniens (PE) sont de plus en plus suspectés. Les PE sont définis comme des substances ou mélanges de substances, qui altèrent les fonctions du système endocrinien et de ce fait induisent des effets néfastes dans un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de (sous)-populations [11,166]. De nombreux travaux ont permis d'améliorer les connaissances de l'impact des PE sur la santé humaine. L'Endocrine Society, la Commission Européenne ou encore l'Agence Européenne de l'Environnement, concluent toutes que les PE ont des effets néfastes sur l'appareil reproducteur (infertilité, malformations, cancers) [14,167,168]. Des liens ont été montrés entre l'exposition du fœtus aux PE et la mauvaise qualité du sperme [169]. Sur la base de ces éléments, ces sociétés savantes mettent en avant le besoin de statuer sur un consensus appelant à agir [170].

Les PE sont retrouvés dans de nombreuses familles chimiques, que ce soient des molécules naturelles (hormones, nitrates) ou de synthèse (pesticides, résidus médicamenteux, conservateurs, plastifiants). Parmi ces familles est retrouvée celle des parabènes. Cette famille de molécules, largement utilisées depuis près d'un siècle dans les aliments, les cosmétiques et les médicaments, regroupe les esters de l'acide parahydroxybenzoïque. Le méthylparabène, l'éthylparabène, le propylparabène et le butylparabène sont les composés les plus fréquemment retrouvés. Ces molécules sont suspectées d'être à l'origine d'effet sur la santé humaine. Ainsi, plusieurs études ont démontré le lien entre l'exposition aux parabènes et des effets perturbateurs endocriniens chez l'homme, avec notamment des effets sur les concentrations en hormones sexuelles, en hormones thyroïdiennes ou encore sur le développement de cancers [12,121,138,139,171]. Récemment, il a également été démontré un lien entre l'exposition aux parabènes et une accélération de la puberté chez les garçons [140]. Face à ces données, les autorités sanitaires nationales et internationales recommandent d'en limiter leur utilisation. Ainsi, l'Union Européenne a prévu d'en restreindre l'utilisation chez l'enfant de moins de 3 ans (propyl- et butylparabène) voire d'en interdire complètement l'utilisation (isopropyl-, isobutyl-, phényl-, benzyl- et pentylparabène) [172]. De la même façon, une tentative d'inscrire l'interdiction complète de ces produits dans la loi française a été lancée en 2011. L'European Medicine Agency (EMA) a, quant à elle, entamé une série de réflexions sur l'utilisation du méthyl et du propylparabène dans les médicaments utilisés par voie orale [154]. A l'heure actuelle, l'EMA considère que les preuves cliniques concernant les effets des parabènes sont insuffisantes, tout en soulignant le risque plus grand pour la population pédiatrique. L'EMA recommande que l'utilisation de parabènes comme conservateurs dans un médicament nécessite une justification toute particulière et que l'utilisation de ces substances soit évitée, en particulier en cas de formulation pédiatrique. Enfin, la concentration utilisée doit être la plus basse possible. De même, en l'absence de consensus sur les effets des

parabènes sur la santé, l'Académie Nationale de Pharmacie a émis des recommandations notamment pour limiter l'utilisation des parabènes dans les médicaments destinés aux jeunes enfants [155].

En effet, le nouveau-né est particulièrement vulnérable à l'exposition aux PE du fait du développement des grands systèmes à cette période de la vie et notamment du développement du système endocrinien. Avec la période fœtale, le début de la période postnatale constitue une fenêtre de susceptibilité importante aux perturbateurs endocriniens avec la poursuite du développement du système nerveux central et la mise en place et l'activation des mécanismes de rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadique [12]. Cette susceptibilité est encore plus vraie chez les nouveau-nés prématurés dont le développement est moins avancé. Par ailleurs, il existe un risque de surexposition lié à l'immatrité de leur système métabolique car les parabènes subissent un important métabolisme hépatique conduisant à la formation de métabolites n'ayant pas démontré d'effets perturbateurs endocriniens [80]. Le prématuré présente donc un risque d'accumulation, en particulier lors d'une administration répétée. L'immatrité de la fonction rénale peut également participer à cette accumulation en diminuant l'excrétion de la forme inchangée des parabènes [173].

Cette population est également très exposée aux médicaments pour prévenir ou traiter les pathologies fréquemment retrouvées dans cette population. Leurs particularités physiologiques impliquent l'utilisation de formes pharmaceutiques susceptibles de contenir plus fréquemment des conservateurs comme les parabènes (formes orales liquides, formes injectables). Cette hypothèse est corroborée par deux études qui ont mis en évidence une augmentation des concentrations urinaires et sanguines en parabènes par rapport à une population adulte. Les auteurs avançant que l'utilisation intensive de médicaments contenant des parabènes chez les nouveau-nés prématurés hospitalisés dans des unités de soins intensifs conduirait à une exposition plus importante que la population générale [89,162].

C'est pourquoi il est indispensable d'explorer les pratiques de prise en charge des nouveau-nés, et plus particulièrement des prématurés, hospitalisés dans les services de néonatalogie français, afin d'identifier clairement dans quelle mesure les médicaments peuvent être une source d'exposition aux parabènes. Aussi, l'objectif de cette étude a été d'identifier les médicaments contenant des parabènes utilisés en réanimation néonatale dans un CHU français et de quantifier l'apport en parabènes via ces médicaments chez les nouveau-nés hospitalisés.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Identification des médicaments contenant des parabènes et de leur teneur

L'identification des médicaments comportant des parabènes dans leur formulation a été réalisée à partir de la base de données Thériaque<sup>®</sup>, par utilisation de la recherche de spécialités avec excipients. Quatre parabènes ont été recherchés sous leur forme parent ou sous leur forme de sel sodique (Tableau 4).

*Tableau 4: Mots clés utilisés pour la recherche par excipient dans la base de données Thériaque<sup>®</sup>*

| <b>Forme parent</b>         | <b>Forme sel sodique</b>            |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Parahydroxybenzoate methyle | Parahydroxybenzoate methyle sodique |
| Parahydroxybenzoate ethyle  | Parahydroxybenzoate ethyle sodique  |
| Parahydroxybenzoate propyle | Parahydroxybenzoate propyle sodique |
| Parahydroxybenzoate butyle  | Parahydroxybenzoate butyle sodique  |

Tous les patients hospitalisés dès leur naissance dans le service de réanimation néonatale du CHU de Poitiers ont été inclus dans l'étude. La période d'inclusion s'est étendue du 01/11/2017 au 30/11/2017. Le recueil des prescriptions médicamenteuses a été réalisé tout au long de leur hospitalisation dans le service de réanimation néonatale. Pour chaque patient, les données suivantes ont été recueillies : poids, sexe, âge gestationnel à la naissance, durée d'hospitalisation ainsi que l'ensemble des prescriptions médicamenteuses (dénomination commune internationale, laboratoire pharmaceutique, posologie, voie d'administration, durée de traitement). Ces données ont été recueillies conformément au cadre de la méthodologie de référence MR-001 pour laquelle notre hôpital est accrédité par la CNIL.

La liste des médicaments prescrits aux nouveau-nés hospitalisés a été confrontée à celle des médicaments contenant des parabènes. Pour chaque médicament prescrit et identifié comme contenant des parabènes, un dosage par chromatographie liquide haute performance avec détection ultraviolet (HPLC-UV) a été réalisé afin de déterminer la quantité exacte de parabènes contenus dans chaque spécialité. Brièvement, l'appareillage chromatographique était composé d'une pompe L6220 (Merck<sup>®</sup>, Lyon, France), d'un injecteur 717 plus (Waters<sup>®</sup>, Milliford, USA), d'un détecteur UV 486 (Waters<sup>®</sup>, Milliford, USA) réglé sur une longueur d'onde de 254 nm et d'un système de traitement de données (EZchrom Elite<sup>®</sup>). La phase mobile (1 mL/min) était constituée d'un mélange d'acétonitrile et d'eau (40/60, v/v) tandis que la séparation était assurée par une colonne Purospher C18 Lichrocart (150 x 4,6 mm, 5 µm, Merck<sup>®</sup>, Lyon, France). L'extraction des parabènes a été réalisée en diluant au

20ème chaque médicament dans de l'acétonitrile. La solution obtenue a ensuite été vortexée pendant 30 secondes et soniquée pendant 10 minutes. Après centrifugation, le supernageant a été dilué au 5<sup>ème</sup> ou 20ème avec un mélange eau/acétonitrile (50/50). Pour chaque médicament, le rendement d'extraction était compris entre 90 et 100%.

La méthode de dosage a été validée selon les recommandations du chapitre « Validation de méthode analytique » du guide GERPAC/SFPC [174]. La méthode était linéaire sur la gamme d'étalonnage utilisée ( $r^2 \geq 0,997$ ) et la limite de quantification était de 0,13 µg/mL. Les coefficients de variation de la précision étaient inférieurs à 12% et les taux de recouvrement de la justesse étaient compris entre 92 et 113%.

Les quantités journalières moyennes et cumulées de parabènes administrées ont été calculées en tenant compte des concentrations obtenues pour chaque spécialité et des doses prescrites. Ce calcul a été réalisé pour chaque enfant inclus. La fréquence d'exposition a été calculée en faisant le rapport du nombre de jours où un patient a reçu des médicaments contenant des parabènes sur le nombre total de jours d'hospitalisation du patient, exprimé en pourcentage.

Les patients ont été répartis en deux groupes en fonction de l'âge gestationnel à la naissance : nouveau-né à terme (âge gestationnel supérieur à 37 semaines d'aménorrhée) ou prématurité (âge gestationnel inférieur à 37 SA). Une analyse statistique basée sur un test de Student a été réalisé pour comparer ces 2 groupes ( $\alpha = 5\%$ ).

### **3. RESULTATS**

La consultation de la base de données Thériaque® a permis de répertorier 393 spécialités pharmaceutiques contenant des parabènes, soit environ 4% de l'ensemble des spécialités commercialisées en France. Le méthylparabène et le propylparabène sont les 2 composés les plus fréquemment retrouvés tandis que l'éthylparabène et le butylparabène sont plus faiblement présents. La répartition des différents parabènes dans les spécialités médicamenteuses est présentée dans le Tableau 5.

Tableau 5: Répartition des parabènes dans les spécialités pharmaceutiques.

|                       | Nombre de spécialités concernée | Proportion (%) |
|-----------------------|---------------------------------|----------------|
| <b>Méthylparabène</b> | 361                             | 91,8           |
| <b>Ethylparabène</b>  | 19                              | 4,8            |
| <b>Propylparabène</b> | 275                             | 70,0           |
| <b>Butylparabène</b>  | 4                               | 1,0            |

Parmi les spécialités identifiées, 65% comportaient une association de deux parabènes dont l'association méthylparabène et propylparabène est majoritaire. Concernant les voies d'administration, les formes galéniques destinées à la voie orale représentent 73,8 % des médicaments comportant des parabènes avec une majorité de formes liquides (suspensions buvables, sirops...) (Tableau 6).

Tableau 6: Proportion des formes galéniques parmi les spécialités identifiées comme contenant des parabènes.

| Voie d'administration      | Proportion (%) |
|----------------------------|----------------|
| <b>Orale, dont :</b>       | <b>73,8</b>    |
| <i>Formes solides</i>      | 18,1           |
| <i>Formes liquides</i>     | 76,9           |
| <i>Formes semi-solides</i> | 5,0            |
| <b>Injectable</b>          | 4,7            |
| <b>Externe</b>             | 16,8           |
| <b>Autres</b>              | 4,7            |

L'étude prospective permettant le recueil des prescriptions médicamenteuses a permis d'inclure et de suivre vingt-deux enfants durant toute leur durée d'hospitalisation dans le service de réanimation néonatale du CHU de Poitiers. Parmi eux, 17 étaient des nouveau-nés prématurés (âge gestationnel moyen à la naissance :  $27,8 \pm 2,6$  SA) et 5 étaient des enfants nés à terme (âge gestationnel moyen à la naissance :  $38,2 \pm 1,8$  SA). Les principales caractéristiques de la population étudiée sont présentées dans le Tableau 7. Le choix d'inclure les nouveau-nés hospitalisés en réanimation néonatale s'est fait au regard des nombreux médicaments administrés à cette population.

Tableau 7: Caractéristiques de la population d'étude (n = 22).

| <b>Caractéristiques</b>   |             |
|---|-------------|
| <b>Sexe masculin</b>  | 50 %        |
| <b>AG moyen (semaines, moyenne ± écart-type)</b>                    | 30,5 ± 4,9  |
| <b>Poids moyen à la naissance (kg, moyenne ± écart-type)</b>        | 1,47 ± 0,79 |
| <b>Durée d'hospitalisation moyenne (jour, moyenne ± écart-type)</b> | 21,1 ± 17,7 |

Au total, 440 prescriptions ont été recueillies et analysées, avec un nombre moyen de médicaments par prescription de  $6,7 \pm 1,95$ . Une très grande partie de ces prescriptions (81,1%) contenaient au moins un médicament avec des parabènes. Tous les enfants inclus dans l'étude ont été exposés au moins une fois au méthyle et au propylparabène, tandis que 45,4% ont été exposés au moins une fois à l'éthylparabène. Aucun enfant n'a été exposé au butylparabène. Tous composés confondus, la durée moyenne d'exposition était de  $16,9 \pm 13,9$  jours. Concernant les nouveau-nés prématurés, la durée moyenne d'exposition était de  $20,0 \pm 13,5$  jours et la fréquence d'exposition moyenne de  $78,6 \pm 20,1$  %, en relation avec la durée moyenne d'hospitalisation qui était de  $26,0 \pm 17,3$  jours. Pour les nouveau-nés à terme, cette durée moyenne d'exposition était de  $3,2 \pm 2,6$  jours, et la fréquence d'exposition moyenne de  $65,0 \pm 37,9$  %, en relation avec la durée moyenne d'hospitalisation de la  $4,8 \pm 2,3$  jours (Tableau 9).

Parmi les médicaments prescrits, huit d'entre eux ont été identifiés comme contenant des parabènes. Parmi eux, deux étaient des préparations hospitalières. Six étaient des formes orales liquides et deux des formes injectables prêts à l'emploi. Les dosages réalisés sur ces 8 médicaments sont présentés dans le Tableau 8. En moyenne, chaque nouveau-né a reçu 2,8 médicaments différents contenant des parabènes.

Tableau 8: Teneur en parabènes des médicaments prescrits et identifiés comme contenant des parabènes ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; moyenne  $\pm$  écart-type)

|                      | Méthyle            | Ethyle          | Propyle          |
|----------------------|--------------------|-----------------|------------------|
| <b>Spécialité 1</b>  | 1416,2 $\pm$ 36,5  | 0               | 169,9 $\pm$ 5,2  |
| <b>Spécialité 2</b>  | 873,2 $\pm$ 60,7   | 0               | 83,3 $\pm$ 5,9   |
| <b>Spécialité 3</b>  | 285,5 $\pm$ 61,9   | 179,1 $\pm$ 9,4 | 26,3 $\pm$ 5,3   |
| <b>Spécialité 4</b>  | 920,8 $\pm$ 40,8   | 0               | 141,6 $\pm$ 7,2  |
| <b>Spécialité 5</b>  | 4519,9 $\pm$ 303,6 | 0               | 522,1 $\pm$ 53,1 |
| <b>Spécialité 6</b>  | 1113,1 $\pm$ 42,5  | 0               | 82,5 $\pm$ 5,2   |
| <b>Préparation 1</b> | 343,2 $\pm$ 5,0    | 0               | 31,4 $\pm$ 0,9   |
| <b>Préparation 2</b> | 321,0 $\pm$ 19,9   | 0               | 29,5 $\pm$ 1,6   |

La quantité moyenne de parabènes reçue par chacun des 22 patients a été calculée à partir des concentrations obtenues lors du dosage par HPLC-UV des parabènes dans les spécialités concernées. Les quantités moyennes et cumulées de parabènes reçues par les nouveau-nés sont présentées dans le Tableau 6. Aucune différence significative n'a été observée entre les prématurés et les nouveau-nés à terme concernant les quantités moyennes ( $p = 0,271$ ,  $0,355$  et  $0,258$  pour le méthyl-, l'éthyl- et le propylparabène respectivement). Pour les quantités cumulées, une différence significative a été observée entre les 2 groupes pour le méthyl- et le propylparabène ( $p < 0,01$ ) mais pas pour l'éthylparabène ( $p = 0,13$ ).



Tableau 9: Exposition des nouveau-nés hospitalisés aux parabènes via les médicaments.

|                                   |                                       | Méthyle         | Ethyle          | Propyle        |
|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| <b>Population globale</b>         |                                       |                 |                 |                |
| <b>Fréquence d'exposition</b>     | <i>Moyenne ± écart-type (%)</i>       | 75,5 ± 24,8     | 19,1 ± 24,8     | 75,5 ± 24,8    |
|                                   | <i>Minimum - maximum</i>              | 25,0 – 100,0    | 0,0 – 85,0      | 25,0 – 100,0   |
| <b>Quantité journalière reçue</b> | <i>Moyenne ± écart-type (µg/kg/j)</i> | 450,9 ± 286,4   | 329,9 ± 102,4   | 45,1 ± 26,1    |
|                                   | <i>Minimum - maximum</i>              | 109,7 – 1096,2  | 223,3 – 448,3   | 10,4 – 90,2    |
| <b>Quantité cumulée reçue</b>     | <i>Moyenne ± écart-type (µg/kg)</i>   | 6982,9 ± 7580,2 | 1185,3 ± 2034,5 | 702,5 ± 772,4  |
|                                   | <i>Minimum - maximum</i>              | 453,3 – 22207,6 | 0 – 6085,2      | 43,2 – 2834,2  |
| <b>Prématurés</b>                 |                                       |                 |                 |                |
| <b>Fréquence d'exposition</b>     | <i>Moyenne ± écart-type (%)</i>       | 78,6 ± 20,1     | 15,9 ± 25,5     | 78,6 ± 20,1    |
|                                   | <i>Minimum - maximum</i>              | 33,3 – 100,0    | 0,0 – 85,0      | 33,3 – 100,0   |
| <b>Quantité journalière reçue</b> | <i>Moyenne ± écart-type (µg/kg/j)</i> | 414,6 ± 294,1   | 303,3 ± 100,1   | 41,5 ± 26,1    |
|                                   | <i>Minimum - maximum</i>              | 109,7 – 1096,2  | 223,9 – 447,2   | 10,4 – 88,6    |
| <b>Quantité cumulée reçue</b>     | <i>Moyenne ± écart-type (µg/kg)</i>   | 8618,7 ± 7922,3 | 1394,2 ± 2277,6 | 865,7 ± 810,4  |
|                                   | <i>Minimum - maximum</i>              | 453,3 – 22207,6 | 0 – 6085,2      | 43,24 – 2834,2 |
| <b>Nouveau-nés à terme</b>        |                                       |                 |                 |                |
| <b>Fréquence d'exposition</b>     | <i>Moyenne ± écart-type (%)</i>       | 65,0 ± 37,9     | 30,0 ± 20,9     | 65,0 ± 37,9    |
|                                   | <i>Minimum - maximum</i>              | 25,0 – 100,0    | 0,0 – 50,0      | 25,0 – 100,0   |
| <b>Quantité journalière reçue</b> | <i>Moyenne ± écart-type (µg/kg/j)</i> | 572,0 ± 249,0   | 360,7 ± 123,2   | 57,3 ± 25,0    |
|                                   | <i>Minimum - maximum</i>              | 250,6 – 818,2   | 223,9 – 448,3   | 28,5 – 90,2    |
| <b>Quantité cumulée reçue</b>     | <i>Moyenne ± écart-type (µg/kg)</i>   | 1421,5 ± 758,8  | 475,1 ± 404,8   | 147,4 ± 81,1   |
|                                   | <i>Minimum - maximum</i>              | 713,7 – 2539,4  | 0 – 1119,4      | 65,7 – 253,8   |

## 4. DISCUSSION

Cette étude met en évidence le fait que les nouveau-nés hospitalisés en réanimation néonatale sont particulièrement exposés aux parabènes via les médicaments qui leur sont administrés. En effet, l'ensemble des nouveau-nés inclus dans notre étude prospective ont reçu au moins une fois du méthyl et du propylparabène durant leur hospitalisation tandis que près de la moitié ont été exposés à l'éthylparabène. En revanche, aucun enfant n'a été exposé au butylparabène. Cette différence d'exposition entre les composés de la même famille est cohérente avec leur répartition dans les spécialités pharmaceutiques. En effet, le méthyl- et le propylparabène sont les parabènes les plus retrouvés dans la composition des médicaments, notamment en combinaison afin d'obtenir un effet synergique. L'effet antimicrobien augmente avec la taille de la chaîne alkyl tandis que la solubilité diminue en fonction du même paramètre. Par ailleurs, si les médicaments impliqués appartiennent à des classes pharmaceutiques différentes (diurétiques, antalgiques, antiinfectieux...), ils ont tous une forme galénique liquide, souvent présentée en flacon multidose, dont la stabilité (microbienne et physico-chimique) peut être plus difficile à maintenir. Ces formes nécessitent alors l'ajout de conservateurs en tant qu'excipients pour répondre aux critères de la Pharmacopée Européenne [175]. De plus, les nouveau-nés hospitalisés en réanimation, étant donné leurs pathologies et leurs caractéristiques physiologiques, reçoivent plus souvent des traitements injectables ainsi que des formes orales liquides. Parmi les médicaments impliqués, deux étaient des préparations hospitalières, il est donc important d'en tenir compte pour évaluer le risque d'exposition mais également d'inciter les pharmaciens hospitaliers au développement et à l'utilisation de préparations sans parabènes [176].

Un autre facteur de variation d'exposition identifié dans cette étude est l'âge gestationnel à la naissance. Ainsi, si les nouveau-nés prématurés reçoivent des doses journalières moyennes moins importantes que les nouveau-nés à terme, quel que soit le parabène évalué, la fréquence d'exposition est plus importante dans cette population, excepté pour l'éthylparabène. Un nouveau-né prématuré aura donc plus de risque d'être exposé au méthyl- et au propylparabène qu'un enfant né à terme. Par ailleurs, la dose cumulée reçue sur la durée d'hospitalisation est plus importante chez le prématuré pour les trois parabènes.

Ces données, même si obtenues sur un échantillon restreint, démontrent que les nouveau-nés hospitalisés sont particulièrement à risque d'être exposés aux parabènes via les médicaments, en plus des autres sources d'exposition potentielles (alimentation, cosmétiques). Nos résultats montrent également une variabilité importante en termes d'exposition aux parabènes pouvant s'expliquer par la diversité des pathologies et donc des traitements prescrits dans cette population de patients.

Peu d'études se sont intéressées à l'exposition des nouveau-nés aux excipients des médicaments de façon générale et aux parabènes en particulier. Cependant, toutes sont en accord avec nos résultats. Trois études, menées en Estonie, au Brésil et en Espagne, ont décrit l'exposition des nouveau-nés aux excipients des médicaments considérés comme nocifs, incluant les parabènes [158–160]. Ces études étaient rétrospectives et, comme nous, limitées à un unique service (deux pour l'Estonie). Nos résultats sont en accord avec ces études qui ont mises en évidence la prescription très fréquente de médicaments contenant des parabènes chez les nouveau-nés hospitalisés. Elles ont également montré que ces prescriptions étaient plus fréquentes chez les enfants prématurés. En revanche, aucune d'entre elles n'a quantifié cette exposition aux parabènes via les médicaments.

Une autre étude, réalisée dans un grand nombre de services de néonatalogie (81 services issue de 21 pays européens dont la France) mais réalisée sur une seule journée de prescription, révèle que 19% des prescriptions comportaient des médicaments contenant des parabènes et que 43% des nouveau-nés étaient exposés aux parabènes via les médicaments administrés, ce qui est inférieur au taux constaté dans notre étude. Cette différence avec nos résultats pourrait être imputable aux variations de prise en charge thérapeutique des nouveau-nés observées dans cette même étude [161]. Cependant, la fréquence d'exposition était également d'autant plus importante que le niveau de prématurité était grand, avec une proportion d'environ 55% pour les très grands prématurés (âge gestationnel médian de 183 jours) contre près de 35% chez les nouveau-nés à terme. Mais, comme les études précédentes, cette étude n'a pas quantifié l'exposition aux parabènes.

Une seule étude a estimé la quantité de parabènes (méthyl et propylparabène) reçue par des nouveau-nés hospitalisés via l'administration de médicaments [162]. Cette étude rétrospective réalisée dans 5 services de néonatalogie (4 en Angleterre et 1 en Estonie) a recueilli les prescriptions de 181 nouveau-nés hospitalisés nés à terme ou prématurément. Chaque enfant avait reçu en moyenne 32,5 et 20,3 doses de méthyl et propylparabène respectivement, majoritairement par voie orale. La moyenne de la durée d'administration des médicaments contenant ces parabènes était de 14 jours, avec des doses journalières moyennes estimées à  $0,58 \pm 0,31$  mg/kg et  $0,14 \pm 0,10$  mg/kg de méthyl et de propylparabène respectivement. Cette étude rétrospective a également mesuré les concentrations sanguines en parabènes de cette population. Les concentrations de méthylparabène mesurées dans le sang des nouveau-nés (âge gestationnel moyen à la naissance de 222 jours) étaient de 13,0 ng/mL soit près de dix fois plus élevées que les taux mesurés dans le plasma d'adultes sains (1,57 ng/mL) [163]. Le propylparabène a été retrouvé à des concentrations supérieures à 10 ng/mL dans plus de 25% des prélèvements réalisés chez ces nouveau-nés hospitalisés alors que la concentration médiane retrouvée chez l'adulte sain était de 0,32 ng/mL dans l'étude danoise. Par ailleurs, les taux sanguins retrouvés

chez ces nouveau-nés recevant des médicaments contenant des parabènes sont bien supérieurs à ceux mesurés à l'accouchement dans le sang de cordon (environ 2,2 et 0,3 ng/mL en médiane, pour le méthyl- et le propylparabène respectivement) [164]. Dans une autre étude, le méthyl- et le propylparabène ont été recherchés dans les urines et détectés chez tous les nouveau-nés étudiés avec des taux médians respectivement de 243 et 17 ng/mL pour le méthyl- et le propylparabène respectivement. Ici aussi, comparativement à l'adulte sain, les taux mesurés sont supérieurs dans la population prématurée. Les auteurs avancent que l'utilisation intensive de médicaments contenant des parabènes chez les nouveau-nés prématurés hospitalisés dans des unités de soins intensifs conduirait à une exposition plus importante que la population générale.

Nos résultats, en accord avec ces études, montrent que les médicaments constituent une source d'exposition non-négligeable aux parabènes chez les nouveau-nés prématurés. De plus, l'immatunité de leur système métabolique est susceptible de favoriser la surexposition de cette population. En effet, les parabènes subissent un important métabolisme hépatique conduisant à la formation de métabolites n'ayant pas démontré d'effets perturbateurs endocriniens. Quel que soit le parabène, il est principalement métabolisé en acide 4-hydroxybenzoïque par des carboxylestérases (hCE1 et hCE2) ou conjugué sous forme de sulfate ou de glucuronide par des sulfotransférases et des UDP glucuronotransférases (UGT) présentes dans le foie [120]. Or, les données in vitro ont montré que l'expression et l'activité des carboxylestérases humaines étaient liées à l'âge, avec des niveaux significativement plus bas dans les premiers stades de vie. Le nouveau-né et a fortiori le prématuré présentent donc un risque d'accumulation des parabènes, en particulier lors d'une administration répétée comme cela peut être le cas pour les médicaments.

Actuellement, il n'existe pas de réglementation interdisant l'utilisation des parabènes en France mais seulement des recommandations limitant leur utilisation [177,178]. La seule valeur toxicologique de référence pour les parabènes est la dose journalière admissible (DJA) fixée à 10 mg/kg/j par l'OMS pour le méthyl- et l'éthylparabène. Aucune DJA n'a été défini pour le propylparabène mais une LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) a été proposée à 10 mg/kg/j [179]. L'exposition moyenne à ces parabènes obtenue dans notre étude est inférieure à ces valeurs mais le calcul de ces valeurs seuils ne prend pas en compte l'effet reconnu à faible dose des PE. Concernant plus particulièrement les parabènes, plusieurs études ont démontré l'effet oestrogénique de ces composés à de faibles doses, avec des concentrations plasmatiques et/ou urinaires faibles [138,140,171,180]. Parallèlement, une étude a estimé que l'exposition moyenne de la population générale à ces composés était de l'ordre de 1,03, 0,83 et 0,59 mg/kg/j pour le méthyl-, le propyl- et l'éthylparabène respectivement, démontrant

que la prise en compte du risque des parabènes, et des PE en général, doit également se faire à des valeurs d'exposition plus faible que les valeurs toxicologiques de référence [181].

## **5. CONCLUSION**

Les résultats de notre étude soulignent que les médicaments utilisés chez les nouveau-nés hospitalisés dans un service de réanimation néonatale français sont une source non-négligeable d'exposition aux parabènes, à la fois en termes de fréquence d'exposition et de doses journalières reçues. Ces résultats doivent inciter les professionnels de santé à privilégier des prises en charge thérapeutiques sans parabènes, notamment par l'étude des pratiques de prises en charge des nouveau-nés, et plus particulièrement des prématurés, hospitalisés dans les services de néonatalogie français. Il est également important d'inciter les industriels à proposer des solutions sans parabènes, notamment pour les spécialités identifiées comme indispensables dans la prise en charge des enfants et plus particulièrement des nouveau-nés.

Enfin, si notre étude met en évidence l'exposition aux parabènes des enfants hospitalisés en réanimation néonatale via les médicaments, il serait intéressant d'évaluer la part attribuable au médicament dans l'exposition globale de ces enfants car d'autres sources d'exposition existent, notamment à travers les produits de consommation courante.

# ETUDE PROSPECTIVE MULTICENTRIQUE

## 1. CONTEXTE

L'étude préliminaire menée au CHU de Poitiers sur 22 nouveau-nés (prématurés et à terme) a permis de mettre en évidence que plus de 80% des prescriptions comportaient au moins un médicament contenant des parabènes, exposant ainsi tous les enfants inclus au méthyl et au propylparabène. Cette étude préliminaire avait pour objectif d'explorer la faisabilité d'une étude multicentrique nationale et de déterminer les éléments méthodologiques requis.

L'étude préliminaire a permis d'identifier la difficulté de recueillir de façon fiable l'ensemble des prescriptions, soulignant la nécessité d'utiliser un logiciel permettant de recueillir l'ensemble des prescriptions effectuées chez les nouveau-nés. Pour palier cela, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe de recherche du CEPOI (Centre d'Etudes Périnatales de l'Océan Indien) dirigée par Monsieur le Professeur Jean-Bernard Gouyon. Cette équipe a mis au point un logiciel de prescriptions pédiatriques permettant de recueillir aisément l'ensemble des prescriptions réalisées chez les nouveau-nés hospitalisés.

Même si l'étude préliminaire a permis d'identifier de façon précise les médicaments contenant des parabènes commercialisés en France, nous avons pris le parti de réaliser à nouveau cette identification afin de vérifier l'absence d'évolution des formulations galéniques proposées par les laboratoires pharmaceutiques.

Notre étude a donc pour objectif d'identifier l'exposition des nouveau-nés hospitalisés aux parabènes via l'administration des médicaments et d'étudier les différences d'exposition en fonction des caractéristiques des nouveau-nés et des centres d'inclusion.

## 2. MATERIEL ET METHODE

### 2.1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude multicentrique pour laquelle les données ont été recueillies de façon prospective puis analysées de façon rétrospective. La période d'inclusion et de recueil des données s'est déroulée sur une période de 6 mois, de juillet à décembre 2019. Le recueil des données a été poursuivi sur le mois de janvier 2020 pour les nouveau-nés inclus durant le mois de décembre 2019. Les centres participant à l'inclusion des patients et au recueil des données sont ceux qui utilisent l'outil de prescription Logipren® développé initialement sous l'égide de la Société Française de Néonatalogie.

Toutes les prescriptions de tous les nouveau-nés hospitalisés dans ces établissements sont stockées au sein de chaque établissement puis exportées de façon anonyme vers une base commune de données pour mettre en œuvre des études sur les prescriptions [88]. Seuls les enfants nés sur place ont été inclus dans l'étude afin d'obtenir le recueil des médicaments administrés. Les centres d'inclusion appartiennent à différentes régions du territoire français. La liste des établissements retenus pour être centre d'inclusion est indiqué en Annexe 1.

Concernant les aspects éthiques, il s'agit d'une étude de recherche observationnelle portant sur des « soins courants » mentionnés à l'alinéa 2 de l'article L.1121-1 et à l'article R.1131-3 du Code de la Santé Publique. Les parents des patients seront informés des objectifs de l'étude et de leur droit de refuser de participer à l'étude. Cette étude sera conduite conformément aux standards internationalement reconnus des bonnes pratiques cliniques (ICH E6), en accord avec la réglementation d'Helsinki et les réglementations locales.

## **2.2. Critères d'inclusion**

L'ensemble des patients hospitalisés en réanimation pédiatrique sur cette période dans les centres d'inclusion sélectionnés ont été inclus s'ils répondaient aux critères d'inclusion suivant :

- Nouveau-né ;
- Né dans le centre d'inclusion pendant la période d'inclusion ;
- Hospitalisé dès sa naissance dans le centre d'inclusion.

## **2.3. Critères de non-inclusion**

Les critères de non-inclusion pour cette étude étaient les suivants :

- Naissance dans un centre d'inclusion et transféré secondairement dans un centre d'inclusion
- Refus des parents de participer à la recherche.

## **2.4. Recueil des données**

Le recueil des prescriptions a été réalisé à l'aide du logiciel de prescriptions pédiatrique Logipren®, édité par la société LOGIPREM. En pratique, ce logiciel permet d'informatiser totalement les prescriptions médicales pour les enfants de moins d'un an. Toutes les prescriptions de tous les nouveau-nés hospitalisés dans les établissements équipés sont stockées au sein de chaque

établissement puis exportés mensuellement de façon anonyme vers une base commune de données de prescriptions pour mettre en œuvre un benchmarking des prescriptions, dans le cadre du programme de recherche B-PEN. Ce programme B-PEN a fait l'objet d'une autorisation de la CNIL et son promoteur principal est le Dr. Béatrice GOUYON, son investigateur principal le Pr. Jean-Bernard GOUYON. Afin de pouvoir exploiter de façon prospective les données de prescriptions contenues dans cette base, une convention de partenariat de recherche a été signée avec la société LOGIPREM, exploitant du programme de recherche B-PEN.

Pour chaque nouveau-nés inclus, les données recueillies étaient les suivantes :

- Identifiant du nouveau-né ;
- Centre d'inclusion ;
- Sexe ;
- Date de naissance ;
- Poids de naissance ;
- Âge gestationnel ;
- Date et heure de la prescription ;
- Poids à l'ordonnance ;
- Présentation pharmaceutique du médicament prescrit ;
- Voie d'administration ;
- Posologie.

## 2.5. Identification des médicaments contenant des parabènes

La liste des médicaments contenant des parabènes commercialisés en France a été établie selon la même méthodologie que celle utilisée durant l'étude préliminaire. Les compositions exactes en parabènes (nature et quantité) ont été extraites à partir de la base de données Thériaque® en utilisant la recherche par excipient. Les mots clés utilisés pour réaliser cette recherche sont présentés dans le Tableau 10.

*Tableau 10: Mots-clés utilisés pour la recherche par excipients dans la base de données Thériaque®*

| <b>Forme parent</b>         | <b>Forme sel sodique</b>            |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Parahydroxybenzoate méthyle | Parahydroxybenzoate méthyle sodique |
| Parahydroxybenzoate ethyle  | Parahydroxybenzoate ethyle sodique  |
| Parahydroxybenzoate propyle | Parahydroxybenzoate propyle sodique |
| Parahydroxybenzoate butyle  | Parahydroxybenzoate butyle sodique  |



Pour les spécialités pour lesquelles des informations seront manquantes, la composition a été demandée auprès des laboratoires pharmaceutiques les commercialisant. En cas de refus de ces derniers, un dosage a été effectué selon une méthode préalablement validée par notre équipe de recherche selon les recommandations internationales [182].

## 2.6. Analyse des données

La population d'étude a été décrite selon le nombre de patients inclus, le sexe, l'âge gestationnel à la naissance et le poids de naissance. Le nombre de nouveau-nés inclus par centre, ainsi que leur répartition selon leur âge gestationnel a également été déterminé.

Le nombre de DCI prescrites dans l'étude a été déterminé ainsi que le nombre de lignes de prescriptions, le nombre moyen de DCI reçues par nouveau-nés et leur répartition en fonction des centres. Pour les médicaments contenant des parabènes et prescrits dans l'étude, ils ont été classés en fonction de leur teneur, de leur forme galénique, de leur classe ATC et de leur fréquence de prescription en fonction des centres. Leur nombre de lignes de prescriptions a également été déterminé ainsi que le nombre moyen de médicaments contenant des parabènes reçus par nouveau-né. La prévalence d'exposition à ces médicaments a également été déterminé.

Les quantités journalières moyennes de parabènes administrés via les médicaments, exprimées en mg/kg/j, ont été calculées, de façon générale et pour chaque centre.

Les analyses ont été réalisées en sous-groupes :

- Âge gestationnel à la naissance, selon la catégorisation donnée par l'INSERM [183] :
  - $\geq 37$  SA
  - 32-36 SA
  - 28-31 SA
  - $< 28$  SA
- Poids de naissance :
  - $\geq 1000$  g
  - $< 1000$  g

Ceci a permis d'identifier le niveau d'exposition aux parabènes via les médicaments en fonction du poids et de l'âge gestationnel à la naissance.

Les analyses statistiques (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney-Wilcoxon) ont été effectuées à l'aide du logiciel R associé à la surcouche R studio (logiciels Open Source).

### 3. RESULTATS

#### 3.1. Population d'étude

L'étude réalisée sur 6 mois a permis d'inclure plus de 8000 nouveau-nés. Les caractéristiques démographiques de la population incluse sont décrites dans le Tableau 11. La majorité des patients inclus étaient des nouveau-nés à terme (45,1%), avec une diminution en lien avec l'âge gestationnel à la naissance : 37,1% pour les enfants de 32 à 36 SA, 11,9% pour ceux de 28 à 32 SA et 5,9% pour ceux de moins de 28 SA.

Tableau 11: Caractéristiques démographiques de la population d'étude

| Caractère   |                          |            |             |
|---|--------------------------|------------|-------------|
| <b>Nombre de patients inclus</b>                            | 8078                     |            |             |
| <b>Dont filles</b>  | 3727 (46,1%)             |            |             |
| <b>Dont garçons</b>   | 4351 (53,9%)             |            |             |
| <b>Répartition par âge gestationnel à la naissance (SA)</b> | n                        | Filles (%) | Garçons (%) |
| <b>≥ 37</b>   | 3644                     | 44,3       | 55,7        |
| <b>32-36</b>  | 2995                     | 47,3       | 52,7        |
| <b>28-32</b>  | 966                      | 46,7       | 53,3        |
| <b>&lt;28</b>   | 473                      | 51,8       | 48,2        |
| <b>Poids à la naissance (g)</b>                             | Moyenne ± écart-type (g) |            |             |
| <b>≥ 37</b>   | 3177,92 ± 610,91         |            |             |
| <b>32-36</b>  | 2154,35 ± 492,71         |            |             |
| <b>28-32</b>  | 1330,66 ± 315,59         |            |             |
| <b>&lt;28</b>   | 811,46 ± 179,43          |            |             |

La répartition de l'inclusion des nouveau-nés selon les centres montre une grande variabilité, à la fois en termes de nombres de patients inclus et de répartition des âges gestationnels (Tableau 12).

Tableau 12: Répartition des inclusions selon les centres et l'âge gestationnel à la naissance

| Centre | Nb de nouveau-né inclus | Répartition selon l'âge gestationnel (%) |       |       |      |
|--------|-------------------------|--|-------|-------|------|
|        |                         | <28                                      | 28-31 | 32-36 | > 37 |
| 1      | 328                     | 4,0                                      | 7,6   | 39,3  | 49,1 |
| 2      | 186                     | 7,0                                      | 8,6   | 37,1  | 47,3 |
| 3      | 252                     | 9,5                                      | 11,5  | 41,3  | 37,7 |
| 4      | 69                      | 0,0                                      | 1,4   | 30,4  | 68,1 |
| 5      | 421                     | 5,2                                      | 10,5  | 37,8  | 46,6 |
| 6      | 164                     | 2,4                                      | 8,5   | 34,8  | 54,3 |
| 7      | 208                     | 7,2                                      | 21,2  | 30,8  | 40,9 |
| 8      | 256                     | 3,9                                      | 16,0  | 32,4  | 47,7 |
| 9      | 170                     | 12,4                                     | 15,9  | 35,3  | 36,5 |
| 10     | 138                     | 2,9                                      | 11,6  | 33,3  | 52,2 |
| 11     | 134                     | 3,7                                      | 10,4  | 36,6  | 49,3 |
| 12     | 69                      | 0,0                                      | 5,8   | 30,4  | 63,8 |
| 13     | 198                     | 8,6                                      | 16,7  | 37,4  | 37,4 |
| 14     | 117                     | 0,0                                      | 4,3   | 56,4  | 39,3 |
| 15     | 414                     | 1,9                                      | 9,2   | 44,2  | 44,7 |
| 16     | 263                     | 3,8                                      | 7,2   | 43,0  | 46,0 |
| 17     | 201                     | 2,0                                      | 1,0   | 27,9  | 69,2 |
| 18     | 223                     | 4,9                                      | 14,8  | 44,4  | 35,9 |
| 19     | 342                     | 7,0                                      | 12,6  | 35,1  | 45,3 |
| 20     | 100                     | 1,0                                      | 2,0   | 35,0  | 62,0 |
| 21     | 131                     | 18,3                                     | 31,3  | 16,8  | 33,6 |
| 22     | 271                     | 7,0                                      | 14,8  | 33,9  | 44,3 |
| 23     | 520                     | 6,7                                      | 11,0  | 33,3  | 49,0 |
| 24     | 354                     | 7,1                                      | 19,2  | 32,8  | 41,0 |
| 25     | 209                     | 11,0                                     | 24,4  | 28,7  | 35,9 |
| 26     | 409                     | 6,8                                      | 10,5  | 42,8  | 39,9 |
| 27     | 211                     | 9,0                                      | 11,4  | 49,3  | 30,3 |
| 28     | 201                     | 6,0                                      | 12,4  | 40,8  | 40,8 |
| 29     | 218                     | 5,5                                      | 7,3   | 43,6  | 43,6 |
| 30     | 293                     | 8,5                                      | 17,4  | 34,8  | 39,2 |
| 31     | 190                     | 8,9                                      | 20,5  | 36,3  | 34,2 |
| 32     | 163                     | 4,9                                      | 19,6  | 38,0  | 37,4 |
| 33     | 129                     | 8,5                                      | 3,9   | 25,6  | 62,0 |
| 34     | 245                     | 3,3                                      | 7,3   | 38,0  | 51,4 |
| 35     | 281                     | 0,4                                      | 2,1   | 38,8  | 58,7 |

### 3.2. Médicaments contenant des parabènes

Comparativement à notre étude préliminaire, notre recherche dans la base de données Thériaque® n'a pas rapportée d'évolutions dans la composition en parabènes des médicaments. Ainsi, 393 spécialités pharmaceutiques ont été identifiées comme contenant des parabènes. Parmi elles, 361 (91,8%) contenaient du méthylparabène, 19 (4,8%) de l'éthylparabène, 275 (70%) du propylparabène et 4 (1%) du butylparabène. Il a été majoritairement retrouvé une association de méthyle et de propylparabène (61%) tandis que l'association de trois parabènes (méthyle, éthyle et propyle) était minoritaire (1,5%). Enfin, 35% des médicaments identifiés contenaient un seul parabène.

Parmi ces médicaments, 30 spécialités, soit 26 DCI, ont ensuite été retrouvées dans les prescriptions des patients inclus dans l'étude. Ces médicaments et leurs teneurs en parabènes sont présentés dans le Tableau 13. La totalité contenait du méthylparabène tandis que 25 (83,3%) contenaient du propylparabène et seulement 1 (3,3%) contenant de l'éthylparabène. La majorité de ces médicaments (24, 80%) contenaient une association de méthyle et de propylparabène. Un seul médicament contenait une association de méthyle, d'éthyle et de propylparabène (3,3%). Les autres (5, 16,7%) contenaient uniquement du méthylparabène.

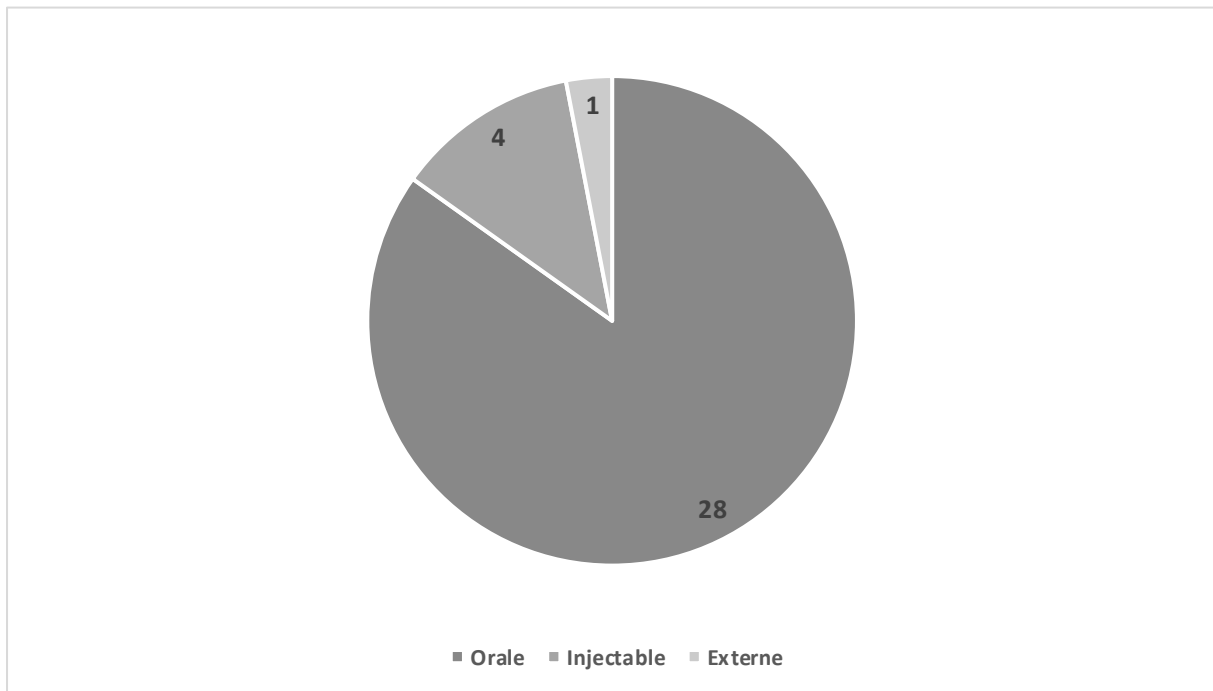
Tableau 13: Médicaments contenant des parabènes prescrits à la population d'étude

| Présentation pharmaceutique du médicament     | Teneur en parabènes (mg/mL) |        |        |      |
|---|-----------------------------|--------|--------|------|
|   | MePb                        | EtPb   | PrPb   | BuPb |
| Acide ursodesoxycholique, susp buv, 50 mg/mL* | 0,15                        | 0      | 0,04   | 0    |
| BACTRIM (200 mg-40 mg), susp buv, 100 mL      | 1                           | 0      | 0      | 0    |
| DEPAKINE 57.64 mg/ml, sirop                   | 1                           | 0      | 0,2    | 0    |
| DIGOXINE 5 mcg/0,1 ml sol buv                 | 1                           | 0      | 0,2    | 0    |
| DOLIPRANE 2.4% ss sucre, susp buv, 100 mL     | 2,855                       | 0,1791 | 0,0263 | 0    |
| DOMPERIDONE 1 mg/ml susp buv                  | 1,8                         | 0      | 0,2    | 0    |
| EPIVIR 10 mg/ml, sol buv, 240 ml              | 1,5                         | 0      | 0,18   | 0    |
| FER 0,68% sirop - FERROSTRANE                 | 1                           | 0      | 0,2    | 0    |
| FLAGYL 4%, susp buv, 120 ml                   | 0,8                         | 0      | 0,2    | 0    |
| FUNGIZONE 10% susp buv                        | 1,15                        | 0      | 0,35   | 0    |
| GAVICON nour 50 mg/26,7 mg/ml susp buv        | 4                           | 0      | 0,6    | 0    |
| GENTAMICINE 10 mg/1 ml amp inj                | 1,3                         | 0      | 0,2    | 0    |
| GENTAMICINE 40 mg/2 ml inj                    | 1,3                         | 0      | 0,2    | 0    |
| GENTAMICINE 80 mg/2 mL, sol inj, amp          | 1,3                         | 0      | 0,2    | 0    |
| JOSACINE 125 mg/5 ml, granulés pour susp buv  | 1,325                       | 0      | 0,175  | 0    |
| JOSACINE 250 mg/5 mL, granulés pour susp buv  | 1,325                       | 0      | 0,175  | 0    |
| KEPPRA 100 mg/mL, sol buv, 150 mL             | 2,7                         | 0      | 0,3    | 0    |
| LASILIX 10 mg/ml sol buv                      | 1                           | 0      | 0,5    | 0    |
| LEVOCARNIL 100 mg/ml, sol buv, 10 ml          | 1,05                        | 0      | 0,45   | 0    |
| LOCAPRED 0,1% crème                           | 1,5                         | 0      | 0      | 0    |
| MYCOSTATINE 100 000 ui/mL, susp buv, 24 mL    | 1                           | 0      | 0,2    | 0    |
| Nicardipine, sol buv, 0,5 mg/mL*              | 0,15                        | 0      | 0,04   | 0    |
| ORACILLINE 250 000 UI / 5 ml Susp buv         | 0,83                        | 0      | 0      | 0    |
| Phenobarbital, susp buv, 10 mg/mL*            | 0,15                        | 0      | 0,04   | 0    |
| POTASSIUM RICHARD sirop                       | 1                           | 0      | 0      | 0    |
| Propranolol Rosemont 5 mg/5 ml sol buv        | 1,2                         | 0      | 0,3    | 0    |
| RIFADINE 2% BUV FL120ML                       | 1,2                         | 0      | 0,3    | 0    |
| SPIRONOLACTONE 5mg/mL susp buv*               | 0,15                        | 0      | 0,04   | 0    |
| THERALENE 4% sol buv                          | 1,107                       | 0      | 0,221  | 0    |
| UN-ALFA, sol buv en gouttes, 10 mL            | 1,5                         | 0      | 0      | 0    |
| VEDROP 50MG/ML SOL BUV                        | 3                           | 0      | 0,9    | 0    |
| VIRAMUNE 50mg/5ml susp buv                    | 1,8                         | 0      | 0,24   | 0    |

*Sol buv* : solution buvable ; *susp buv* : suspension buvable ; *inj* : injectable ; *amp* : ampoule ; \* : préparation pharmaceutique

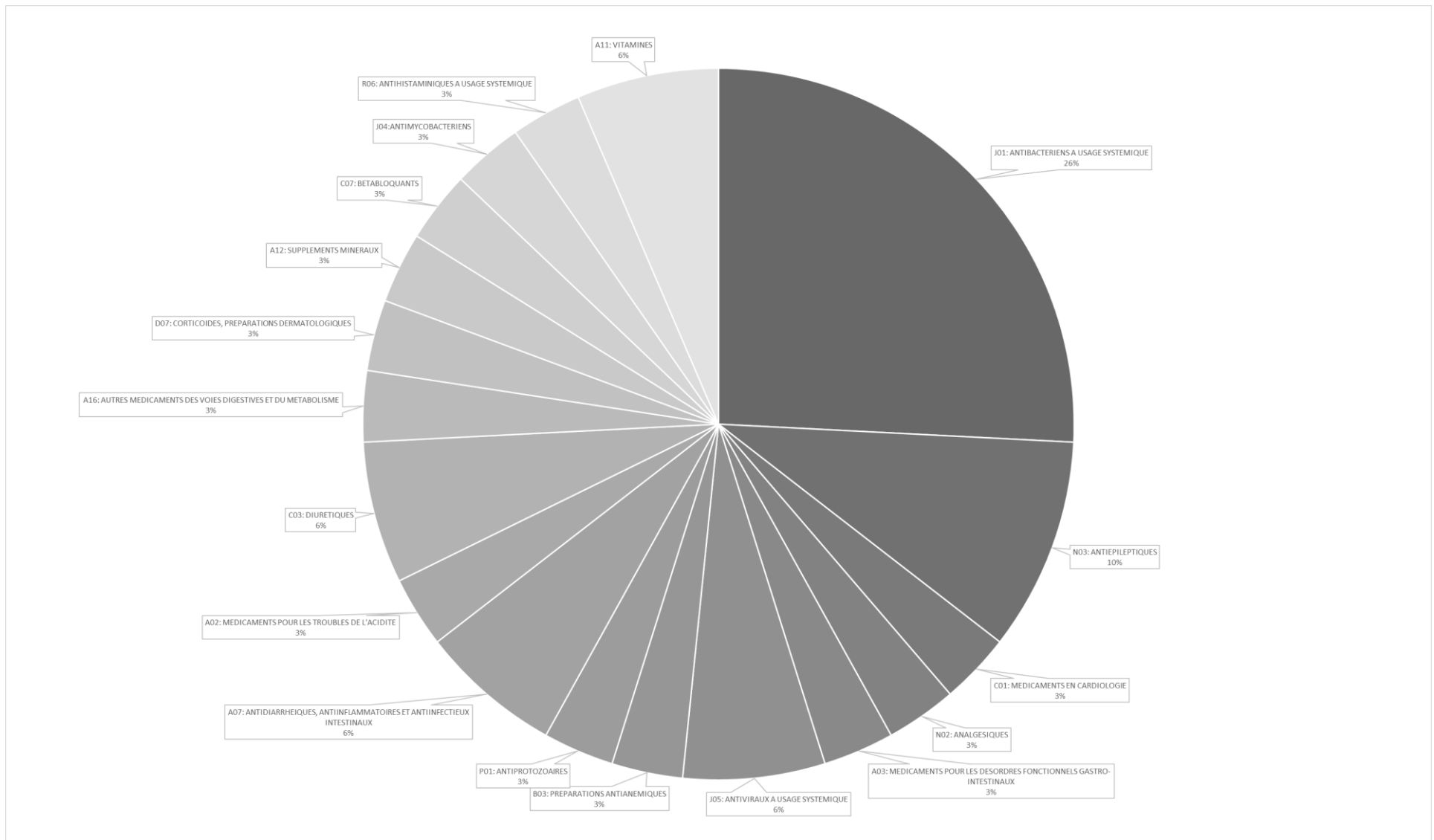
La voie d'administration majoritaire était la voie orale avec des formes galéniques de type suspension ou solution buvable, soit 28 médicaments. Quatre médicaments étaient destinés à la voie injectable et un seul à la voie externe (Figure 8).

Figure 8: Répartition des médicaments contenant des parabènes selon leur forme galénique



Concernant les classes ATC des principes actifs des médicaments contenant des parabènes, les antibactériens à usage systémique sont les médicaments les plus représentés, suivis des antiépileptiques, des diurétiques et des vitamines. Dix-huit classes ATC différents ont été prescrites (Figure 9).

Figure 9: Répartition des médicaments selon leur classe ATC



Au total, ce sont près de 287 DCI différentes (avec ou sans parabènes) qui ont été prescrites aux nouveau-nés, soit une moyenne de  $6,7 \pm 5,9$  DCI utilisées par enfant, ce qui souligne l'importance de la polymédication de cette population.

En moyenne, chaque enfant exposé a reçu  $1,6 \pm 0,9$  médicaments contenant des parabènes.

La répartition du nombre de DCI utilisées par centre est présentée dans le Tableau 14. Le nombre minimum de DCI utilisées par centre était de 26 et le maximum de 118.

*Tableau 14: Nombre de DCI utilisées par centre*

| <b>Centre</b> | <b>Nombre de DCI</b> | <b>Centre</b> | <b>Nombre de DCI</b> |
|---------------|----------------------|---------------|----------------------|
| <b>1</b>      | 82                   | <b>19</b>     | 101                  |
| <b>2</b>      | 80                   | <b>20</b>     | 42                   |
| <b>3</b>      | 63                   | <b>21</b>     | 88                   |
| <b>4</b>      | 26                   | <b>22</b>     | 85                   |
| <b>5</b>      | 88                   | <b>23</b>     | 87                   |
| <b>6</b>      | 52                   | <b>24</b>     | 91                   |
| <b>7</b>      | 94                   | <b>25</b>     | 97                   |
| <b>8</b>      | 84                   | <b>26</b>     | 104                  |
| <b>9</b>      | 61                   | <b>27</b>     | 90                   |
| <b>10</b>     | 82                   | <b>28</b>     | 84                   |
| <b>11</b>     | 70                   | <b>29</b>     | 93                   |
| <b>12</b>     | 37                   | <b>30</b>     | 98                   |
| <b>13</b>     | 72                   | <b>31</b>     | 87                   |
| <b>14</b>     | 40                   | <b>32</b>     | 62                   |
| <b>15</b>     | 118                  | <b>33</b>     | 73                   |
| <b>16</b>     | 61                   | <b>34</b>     | 95                   |
| <b>17</b>     | 42                   | <b>35</b>     | 58                   |
| <b>18</b>     | 56                   |               |                      |

La répartition en fonction de l'âge gestationnel à la naissance est présentée dans le Tableau 15.

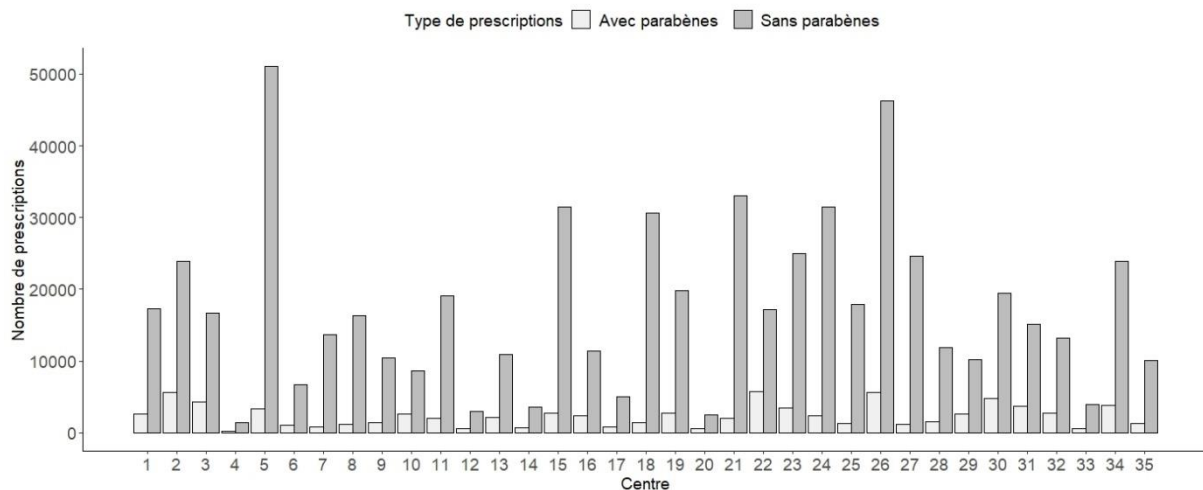


Tableau 15: Nombre de DCI utilisées par AG

| AG    | Nombre de DCI utilisées |
|-------|-------------------------|
| <28   | 188                     |
| 28-31 | 191                     |
| 32-36 | 198                     |
| > 37  | 212                     |

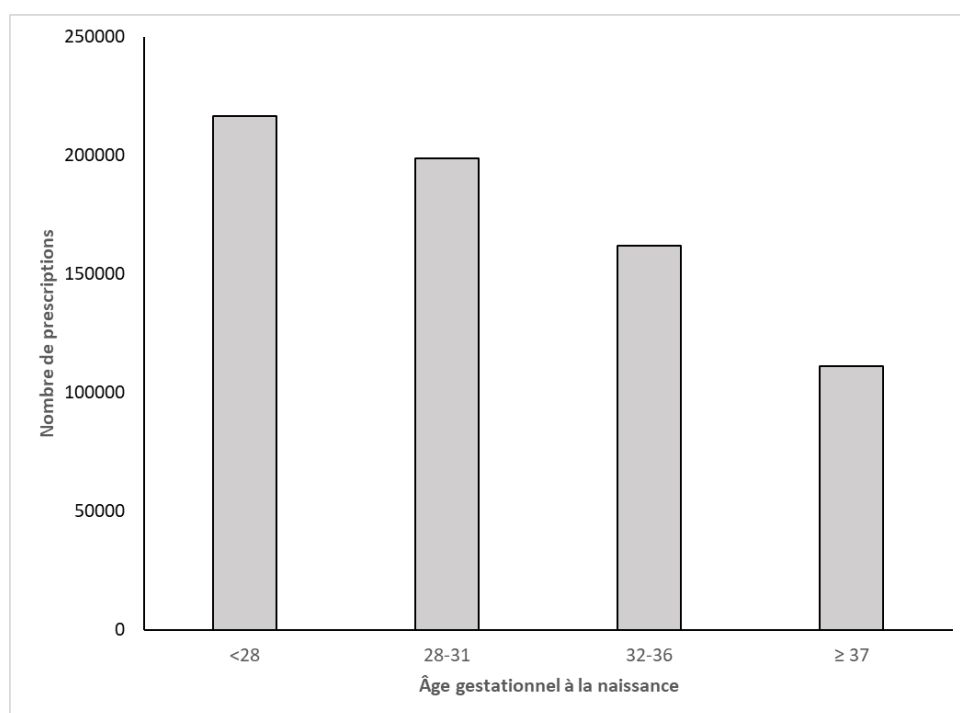
Durant les 6 mois de l'étude, ces 287 DCI ont représenté 688270 lignes de prescriptions, dont 82198 lignes de prescriptions avec des médicaments contenant des parabènes. La répartition de ces prescriptions, qu'elles soient avec ou sans parabènes, en fonction des centres d'inclusion est présentée dans la Figure 10. Le ratio du nombre de prescriptions avec parabènes sur le nombre total de prescriptions variait de 4,5 à 25% avec une moyenne de  $13,0 \pm 5,5\%$ .

Figure 10: Nombre de lignes de prescriptions par centre



Le nombre de lignes de prescription en fonction de l'âge gestationnel est présenté dans la Figure 11. Le nombre moyen de lignes de prescription était de  $85,2 \pm 185,1$  tous âges gestationnels confondus et de  $30 \pm 67,3$ ,  $54,1 \pm 76,1$ ,  $205,5 \pm 225,0$  et  $458,1 \pm 440,9$  pour les nouveau-nés avec un âge gestationnel à la naissance de plus de 37 SA, de 32-36 SA, de 28-31 SA et de moins de 28 SA, respectivement. Le nombre minimal de lignes de prescriptions était de 1 et le nombre maximal de 4193.

Figure 11: Répartition des prescriptions selon l'âge gestationnel à la naissance



L'utilisation des médicaments contenant des parabènes montre des différences importantes à la fois en termes de proportion de centres utilisateurs et de nombre de prescriptions (Tableau 16). Ainsi, le Doliprane® 2,4% en suspension buvable a été prescrit dans tous les centres d'inclusion tandis que plusieurs spécialités tels que la Depakine®, le Théralène® ou encore la Domperidone n'ont été utilisés que par un seul centre. Quatre préparations pharmaceutiques ont été prescrites, une dans 8,6% des centres (Spironolactone 5 mg/mL), tandis que les autres n'ont été utilisées que de façon monocentrique. La répartition des prescriptions n'est pas non plus homogène en fonction des âges gestationnels. Par exemple, l'Epivir® en solution buvable est prescrit majoritairement chez les nouveau-nés à terme tandis que la préparation pharmaceutique de spironolactone est prescrite essentiellement chez les prématurés de moins de 28 semaines d'aménorrhée.

Tableau 16: Répartition des prescriptions de médicaments contenant des parabènes selon les centres d'inclusion et l'âge gestationnel

| Présentation pharmaceutique du médicament   | Proportion centres utilisateurs (%) | Nombre de prescriptions | Âge gestationnel à la naissance |       |       |      |       |       |      |       |
|---|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|
|   |                                     |                         | <28                             |       | 28-31 |      | 32-36 |       | >37  |       |
|   |                                     |                         | n                               | %     | n     | %    | n     | %     | n    | %     |
| FERROSTRANE 0,68% sirop                     | 97,1                                | 35465                   | 8343                            | 23,5  | 14709 | 41,5 | 11604 | 32,7  | 809  | 2,3   |
| DOLIPRANE 2,4% ss suée buv                  | 100,0                               | 18644                   | 3468                            | 18,6  | 3913  | 21,0 | 5717  | 30,7  | 5546 | 29,7  |
| GENTAMICINE 10 mg/1 ml amp inj              | 82,9                                | 11858                   | 2968                            | 25,0  | 2258  | 19,0 | 2696  | 22,7  | 3936 | 33,2  |
| GAVISCON nour 50 mg/267 mg/ml susp buv      | 62,9                                | 2733                    | 640                             | 23,4  | 780   | 28,5 | 923   | 33,8  | 390  | 14,3  |
| MYCOSTATINE 100 000 UI/ml susp buv          | 51,4                                | 1945                    | 516                             | 26,5  | 584   | 30,0 | 429   | 22,1  | 416  | 21,4  |
| SPIRONOLACTONE 5mg/mL susp buv*             | 8,6                                 | 1665                    | 1263                            | 75,9  | 378   | 22,7 | 5     | 0,3   | 19   | 1,1   |
| GENTAMICINE 40mg/2ml                        | 22,9                                | 1395                    | 312                             | 22,4  | 249   | 17,8 | 250   | 17,9  | 584  | 41,9  |
| JOSACINE 125 mg/5 ml susp buv               | 31,4                                | 1187                    | 775                             | 65,3  | 320   | 27,0 | 72    | 6,1   | 20   | 1,7   |
| LASILIX 10 mg/ml sol buv                    | 71,4                                | 1118                    | 138                             | 12,3  | 198   | 17,7 | 377   | 33,7  | 405  | 36,2  |
| LEVOCARNIL 100mg/ml sol buv                 | 14,3                                | 1047                    | 277                             | 26,5  | 445   | 42,5 | 260   | 24,8  | 65   | 6,2   |
| UN-ALFA sol buv                             | 71,4                                | 866                     | 254                             | 29,3  | 68    | 7,9  | 390   | 45,0  | 154  | 17,8  |
| VEDROP 50mg/ml Susp Buv                     | 20,0                                | 831                     | 513                             | 61,7  | 166   | 20,0 | 75    | 9,0   | 77   | 9,3   |
| FUNGIZONE 10% susp buv                      | 31,4                                | 735                     | 150                             | 20,4  | 329   | 44,8 | 167   | 22,7  | 89   | 12,1  |
| EPIVIR 10 mg/ml sol buv                     | 22,9                                | 566                     | 58                              | 10,2  | 94    | 16,6 | 118   | 20,8  | 296  | 52,3  |
| GENTAMICINE 80mg/2ml                        | 11,4                                | 395                     | 20                              | 5,1   | 117   | 29,6 | 101   | 25,6  | 157  | 39,7  |
| KEPPRA 100 mg/ml sol buv                    | 28,6                                | 360                     | 11                              | 3,1   | 3     | 0,8  | 52    | 14,4  | 294  | 81,7  |
| VIRAMUNE 50mg/5ml susp buv                  | 22,9                                | 331                     | 4                               | 1,2   | 25    | 7,6  | 87    | 26,3  | 215  | 65,0  |
| JOSACINE 250 mg/5 ml susp buv               | 11,4                                | 174                     | 129                             | 74,1  | 0     | 0,0  | 29    | 16,7  | 16   | 9,2   |
| FLAGYL 125 mg/5 ml susp buv                 | 28,6                                | 163                     | 28                              | 17,2  | 18    | 11,0 | 89    | 54,6  | 28   | 17,2  |
| DIGOXINE 5 mcg/0,1 ml sol buv               | 17,1                                | 148                     | 0                               | 0,0   | 44    | 29,7 | 101   | 68,2  | 3    | 2,0   |
| RIFADINE 2% susp buv                        | 8,6                                 | 83                      | 46                              | 55,4  | 37    | 44,6 | 0     | 0,0   | 0    | 0,0   |
| BACTRIM, nour et enf, susp buv, flac 100 ml | 8,6                                 | 53                      | 0                               | 0,0   | 20    | 37,7 | 20    | 37,7  | 13   | 24,5  |
| ORACILLINE 250 000 UI / 5 ml Susp buv       | 2,9                                 | 35                      | 0                               | 0,0   | 0     | 0,0  | 0     | 0,0   | 35   | 100,0 |
| THERALENE 4% sol buv                        | 2,9                                 | 23                      | 22                              | 95,7  | 0     | 0,0  | 0     | 0,0   | 1    | 4,3   |
| DEPAKINE 57.64 mg/ml, sirop                 | 2,9                                 | 21                      | 0                               | 0,0   | 0     | 0,0  | 0     | 0,0   | 21   | 100,0 |
| Propranolol Rosemont 5 mg/5 ml sol buv      | 2,9                                 | 21                      | 0                               | 0,0   | 0     | 0,0  | 0     | 0,0   | 21   | 100,0 |
| LOCAPRED 0,1% crème                         | 2,9                                 | 9                       | 9                               | 100,0 | 0     | 0,0  | 0     | 0,0   | 0    | 0,0   |
| DOMPERIDONE 1 mg/ml susp buv                | 2,9                                 | 9                       | 0                               | 0,0   | 0     | 0,0  | 9     | 100,0 | 0    | 0,0   |
| Phenobarbital buvable 10mg/ml*              | 2,9                                 | 5                       | 0                               | 0,0   | 0     | 0,0  | 0     | 0,0   | 5    | 100,0 |
| POTASSIUM RICHARD sirop                     | 2,9                                 | 4                       | 4                               | 100,0 | 0     | 0,0  | 0     | 0,0   | 0    | 0,0   |
| Nicardipine suspension 05 mg/mL*            | 2,9                                 | 66                      | 0                               | 0,0   | 0     | 0,0  | 0     | 0,0   | 66   | 100,0 |
| Acide ursodesoxycholique 50 mg/mL*          | 2,9                                 | 21                      | 0                               | 0,0   | 0     | 0,0  | 21    | 100,0 | 0    | 0,0   |

Sol buv : solution buvable ; susp buv : suspension buvable ; inj : injectable ; amp : ampoule ; \* : préparation pharmaceutique

### 3.3. Exposition des nouveau-nés aux parabènes via les médicaments

#### 3.3.1. Prévalence d'exposition

La fréquence d'exposition aux médicaments contenant des parabènes, en fonction de l'âge gestationnel et du poids de naissance, est présentée dans le Tableau 17. Les résultats montrent que 57,2% des nouveau-nés inclus dans l'étude ont été exposés au moins une fois à un médicament contenant des parabènes durant leur hospitalisation. Le parabène le plus fréquemment retrouvé dans les prescriptions de médicaments était le méthylparabène avec une prévalence d'exposition de 57,2% sur l'ensemble de la population d'étude. Cette prévalence était de 22,7% pour l'éthylparabène et de 56,7% pour le propylparabène. Il n'a pas été retrouvé de prescriptions contenant du butylparabène durant l'étude.

Tableau 17: Prévalence d'exposition aux médicaments contenant des parabènes

|  | <b>Nombre de patients exposés (n, (%))</b> |
|--|--|
| <b>Tout patient</b>                            | 4618 (57,2)                                |
| <i>Répartition selon l'âge gestationnel</i>    |  |
| <b>≥ 37 SA</b>                                 | 1763 (48,4)                                |
| <b>32-36</b>                                   | 1673 (55,9)                                |
| <b>28-32</b>                                   | 779 (80,6)                                 |
| <b>&lt;28</b>                                  | 403 (85,2)                                 |
| <i>Répartition selon le poids de naissance</i> |  |
| <b>≥ 1000 g</b>                                | 4164 (55,3)                                |
| <b>&lt; 1000 g</b>                             | 454 (83,3)                                 |

L'analyse de la prévalence d'exposition montre également une grande variabilité en fonction des centres d'inclusion, allant de 28,9% pour le centre le moins exposant à 94,2% pour le centre avec la plus grande fréquence d'exposition (Tableau 18). Cette différence n'est pas fonction du niveau de prématurité des patients ou du type d'établissement d'inclusion, mais semble due à des différences de pratiques dans l'utilisation des médicaments et notamment ceux contenant des parabènes (Tableau 19). Par exemple, dans le centre 3, 49,6% des nouveau-nés sont exposés via le Ferrostrane<sup>®</sup> alors qu'ils ne sont que 3,1% dans le centre 21. Également, 86,7% des nouveau-nés du centre 22 sont exposés via le Doliprane<sup>®</sup> 2,4% contre 4,2% pour le centre 24.

Tableau 18: Prévalence d'exposition en fonction des centres d'inclusion

| Centre    | Nombre de patients exposés par centre | Fréquence d'exposition (%) | Centre    | Nombre de patients exposés par centre | Fréquence d'exposition (%) |
|-----------|---------------------------------------|----------------------------|-----------|---------------------------------------|----------------------------|
| <b>1</b>  | 211                                   | 64,3                       | <b>19</b> | 224                                   | 65,5                       |
| <b>2</b>  | 150                                   | 80,6                       | <b>20</b> | 59                                    | 59,0                       |
| <b>3</b>  | 168                                   | 66,7                       | <b>21</b> | 109                                   | 83,2                       |
| <b>4</b>  | 40                                    | 58,0                       | <b>22</b> | 254                                   | 93,7                       |
| <b>5</b>  | 237                                   | 56,3                       | <b>23</b> | 219                                   | 42,1                       |
| <b>6</b>  | 89                                    | 54,3                       | <b>24</b> | 130                                   | 36,7                       |
| <b>7</b>  | 102                                   | 49,0                       | <b>25</b> | 128                                   | 61,2                       |
| <b>8</b>  | 162                                   | 63,3                       | <b>26</b> | 260                                   | 63,6                       |
| <b>9</b>  | 69                                    | 40,6                       | <b>27</b> | 93                                    | 44,1                       |
| <b>10</b> | 130                                   | 94,2                       | <b>28</b> | 62                                    | 30,8                       |
| <b>11</b> | 74                                    | 55,2                       | <b>29</b> | 122                                   | 56,0                       |
| <b>12</b> | 44                                    | 63,8                       | <b>30</b> | 205                                   | 70,0                       |
| <b>13</b> | 123                                   | 61,6                       | <b>31</b> | 161                                   | 84,7                       |
| <b>14</b> | 69                                    | 59,0                       | <b>32</b> | 109                                   | 66,9                       |
| <b>15</b> | 191                                   | 44,7                       | <b>33</b> | 57                                    | 44,2                       |
| <b>16</b> | 93                                    | 35,4                       | <b>34</b> | 180                                   | 73,5                       |
| <b>17</b> | 58                                    | 28,9                       | <b>35</b> | 122                                   | 43,4                       |
| <b>18</b> | 121                                   | 54,3                       |           |                                       |                            |

Tableau 19: Fréquences de prescriptions des médicaments contenant des parabènes prescrits chez les nouveau-nés en fonction des centres

| Centre | FERROSTRANE<br>0,68% strop | DOLURANE<br>2,4% buv | GENTAMICINE<br>10 mg/lj | GAUVISCON nour<br>sus buv | MYCOSTATINE<br>100 000 UI/ml<br>sus buv | SPRONOLACTO<br>NE 5mg/mL<br>sus buv PPH | GENTAMICINE<br>40mg/2ml | JOSAGINE 125<br>mg/5 ml sus<br>buv | LASHIL10<br>mg/ml sol buv | LEVOCARNIL<br>100mg/ml sol<br>buv | UN-ALFA sol<br>buv | VEDROP<br>50mg/ml 5sus<br>Rur | FUNGIZONE<br>10% sus buv | EPVIR10<br>mg/ml sol buv | GENTAMICINE<br>80mg/2ml | KEPRA 100<br>mg/ml sol buv | VIRAMUNE<br>50mg/5ml sus<br>buv | JOSAGINE 250<br>mg/5 ml sus<br>buv | FLAGYL 125<br>mg/5 ml sus<br>buv | DIGOXINE 5<br>mcg/0,1 ml sol<br>buv | RIFADINE 2%<br>sus buv | BACTRIM, nour<br>et enf, sus<br>buv, flr, 100 ml | ORACLINEX90<br>000 UI / 5 ml<br>sien buv | THERALENE 6%<br>sol buv | DEPARINE 57,64<br>mg/ml, strop | Propranolol<br>Rosemont 5<br>mg/5 ml sol buv | LOCA PRED 0,1%<br>crème | DOMPERIDONE<br>1 mg/ml sus<br>buv | Phenobarbital<br>barabte<br>13mg/ml | POTASSIUM<br>RICHARD strop | Nicardipine 0.5<br>mg/ml<br>PM | ACIDE<br>URSODESOYIC<br>HOLIQUE50 |     |     |     |
|--------|----------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|---|---|-------------------------|------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------|--|--|-------------------------|--------------------------------|--|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|
| 1      | 14,9                       | 28,7                 | 48,8                    | 5,8                       | 1,2                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 2,1                       | 0,3                               | 0,0                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 1,2                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,6                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 |     |
| 2      | 28,5                       | 67,7                 | 42,5                    | 0,0                       | 0,0                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 2,2                       | 22,0                              | 1,1                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 1,1                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 |     |
| 3      | 49,6                       | 28,6                 | 22,2                    | 13,5                      | 0,0                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 0,4                       | 0,0                               | 1,2                | 0,0                           | 2,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 1,2                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,4                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 |     |
| 4      | 10,1                       | 4,3                  | 30,4                    | 7,2                       | 0,0                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 0,0                       | 0,0                               | 0,0                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 14,5                    | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 |     |
| 5      | 19,0                       | 24,7                 | 18,8                    | 0,0                       | 0,0                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 0,5                       | 0,0                               | 3,3                | 0,0                           | 1,2                      | 0,7                      | 6,2                     | 0,2                        | 0,7                             | 0,0                                | 0,2                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 |     |
| 6      | 20,1                       | 23,2                 | 33,5                    | 6,1                       | 1,2                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 0,0                       | 0,0                               | 0,0                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 7      | 0,0                        | 14,9                 | 41,3                    | 0,5                       | 0,0                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,5                                | 6,7                       | 0,5                               | 0,0                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 1,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 8      | 19,5                       | 23,8                 | 0,0                     | 3,9                       | 1,2                                     | 0,0                                     | 39,5                    | 1,6                                | 0,4                       | 0,0                               | 0,0                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,4                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 9      | 25,9                       | 11,8                 | 0,0                     | 0,0                       | 3,5                                     | 0,0                                     | 12,4                    | 0,0                                | 4,7                       | 0,0                               | 1,2                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 10     | 19,6                       | 73,9                 | 50,0                    | 2,9                       | 0,7                                     | 0,0                                     | 14,5                    | 0,0                                | 2,2                       | 0,0                               | 1,4                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,7                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,7                                      | 0,0                     | 0,7                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,7 | 0,0 | 0,0 |
| 11     | 28,4                       | 26,9                 | 0,0                     | 0,0                       | 0,0                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 3,7                       | 0,0                               | 3,0                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 17,9                    | 0,7                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 12     | 17,4                       | 43,5                 | 11,6                    | 2,9                       | 4,3                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 0,0                       | 0,0                               | 1,4                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 13     | 28,8                       | 17,7                 | 42,9                    | 6,6                       | 0,0                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 1,0                                | 0,0                       | 0,0                               | 2,0                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,5                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 14     | 23,1                       | 11,1                 | 40,2                    | 3,4                       | 0,9                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,9                                | 0,0                       | 0,0                               | 4,3                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 1,7                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 15     | 5,6                        | 17,4                 | 25,8                    | 13,8                      | 14,3                                    | 0,0                                     | 0,0                     | 0,7                                | 4,3                       | 0,0                               | 1,2                | 0,5                           | 0,0                      | 0,2                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,5                             | 0,0                                | 2,9                              | 0,7                                 | 0,0                    | 0,7  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 16     | 16,3                       | 16,0                 | 0,0                     | 7,6                       | 0,8                                     | 0,0                                     | 9,5                     | 0,0                                | 0,4                       | 0,0                               | 1,9                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,8                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 17     | 13,9                       | 9,5                  | 0,0                     | 0,0                       | 1,5                                     | 0,0                                     | 10,0                    | 0,5                                | 0,0                       | 0,5                               | 0,0                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 18     | 27,8                       | 3,6                  | 32,3                    | 0,0                       | 0,4                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 0,4                       | 0,0                               | 5,8                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 19     | 13,2                       | 11,7                 | 58,2                    | 1,5                       | 15,2                                    | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 1,2                       | 0,0                               | 0,6                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,9                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,3                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 20     | 16,0                       | 40,0                 | 17,0                    | 1,0                       | 0,0                                     | 1,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 0,0                       | 0,0                               | 2,0                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 21     | 3,1                        | 9,2                  | 78,6                    | 0,0                       | 0,0                                     | 0,0                                     | 0,8                     | 8,4                                | 4,6                       | 0,0                               | 0,8                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 3,8                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,8                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,8                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 |     |
| 22     | 20,7                       | 86,7                 | 33,9                    | 2,2                       | 0,0                                     | 5,2                                     | 0,0                     | 0,0                                | 1,8                       | 0,0                               | 0,7                | 0,0                           | 0,4                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,4                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,4                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 23     | 26,0                       | 6,5                  | 18,7                    | 1,5                       | 1,7                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 6,0                                | 0,4                       | 0,0                               | 6,3                | 1,2                           | 1,2                      | 0,2                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,4                             | 0,0                                | 1,3                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 24     | 24,6                       | 4,2                  | 8,5                     | 0,0                       | 4,5                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 0,0                       | 0,0                               | 1,4                | 0,3                           | 0,0                      | 0,3                      | 0,0                     | 0,0                        | 1,1                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 25     | 14,4                       | 7,7                  | 0,0                     | 1,0                       | 5,3                                     | 0,0                                     | 55,5                    | 0,0                                | 2,4                       | 0,5                               | 0,5                | 1,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,5                        | 0,5                             | 1,9                                | 0,5                              | 0,0                                 | 0,5                    | 0,0  | 0,0                                      | 1,4                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 26     | 36,2                       | 25,9                 | 32,3                    | 0,0                       | 1,7                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 0,2                       | 0,0                               | 7,6                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,2                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 |     |
| 27     | 9,0                        | 16,6                 | 31,8                    | 0,0                       | 2,4                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,9                                | 1,4                       | 0,0                               | 3,3                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 28     | 26,9                       | 6,0                  | 1,5                     | 0,0                       | 0,0                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,5                                | 0,0                       | 0,0                               | 0,0                | 0,0                           | 1,5                      | 0,5                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,5                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 |     |
| 29     | 34,9                       | 10,6                 | 30,3                    | 0,0                       | 0,0                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,5                                | 1,8                       | 0,0                               | 0,9                | 2,3                           | 6,9                      | 0,0                      | 0,0                     | 1,8                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 30     | 25,9                       | 22,5                 | 54,9                    | 3,4                       | 0,0                                     | 13,3                                    | 0,0                     | 0,0                                | 5,5                       | 0,0                               | 0,0                | 4,1                           | 7,8                      | 2,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 1,7                             | 0,0                                | 1,0                              | 0,0                                 | 0,7                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 31     | 32,1                       | 66,3                 | 55,8                    | 0,0                       | 0,0                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 3,7                       | 0,0                               | 2,6                | 0,0                           | 1,6                      | 0,0                      | 5,3                     | 1,1                        | 0,0                             | 3,7                                | 2,1                              | 0,5                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 32     | 41,1                       | 31,9                 | 42,9                    | 3,1                       | 0,0                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 4,9                       | 0,0                               | 0,0                | 0,0                           | 1,2                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 33     | 14,0                       | 6,2                  | 28,7                    | 2,3                       | 0,0                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 0,0                       | 0,0                               | 0,8                | 0,0                           | 1,6                      | 1,6                      | 0,0                     | 0,0                        | 1,6                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 34     | 33,9                       | 31,4                 | 49,0                    | 4,5                       | 1,6                                     | 0,0                                     | 0,0                     | 0,0                                | 1,2                       | 0,0                               | 0,4                | 0,0                           | 0,0                      | 0,0                      | 0,0                     | 0,0                        | 0,0                             | 0,4                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 1,2  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| 35     | 4,6                        | 6,8                  | 25,3                    | 1,1                       | 0,0                                     | 0,0                                     | 8,5                     | 0,0                                | 1,1                       | 0,0                               | 0,0                | 0,7                           | 1,4                      | 3,9                      | 0,0                     | 0,0                        | 3,9                             | 0,0                                | 0,0                              | 0,0                                 | 0,0                    | 0,0  | 0,0                                      | 0,0                     | 0,0                            | 0,0  | 0,0                     | 0,0                               | 0,0                                 | 0,0                        | 0,0                            | 0,0                               | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

### 3.3.2. Quantification de l'exposition

L'exposition journalière moyenne aux parabènes est liée à l'âge gestationnel à la naissance. Pour le méthyle et le propylparabène, les populations les plus exposées sont les nouveau-nés à terme et les prématurés de moins 28 semaines d'aménorrhée. Pour l'éthylparabène, le groupe le plus exposé était celui des nouveau-nés à terme, avec une décroissance de l'exposition en fonction du niveau de prématurité (Tableau 20).

Tableau 20: Exposition moyenne aux parabènes via l'administration des médicaments (en mg/kg/j)

|                     | MePb          | EtPb          | PrPb          |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Tout patient</b> | 0,654 ± 0,892 | 0,255 ± 0,261 | 0,097 ± 0,136 |
| <b>&gt; 37</b>      | 0,775 ± 0,875 | 0,379 ± 0,301 | 0,103 ± 0,129 |
| <b>32-36</b>        | 0,524 ± 0,806 | 0,209 ± 0,184 | 0,081 ± 0,125 |
| <b>28-31</b>        | 0,608 ± 0,988 | 0,086 ± 0,095 | 0,104 ± 0,156 |
| <b>&lt;28</b>       | 0,754 ± 1,022 | 0,081 ± 0,093 | 0,123 ± 0,163 |

L'analyse de l'exposition montre des différences importantes en fonction des centres d'inclusion (Tableau 21). Ainsi, pour le méthylparabène, l'exposition la plus basse a été retrouvée dans le centre 538 (0,22 ± 0,41 mg/kg/j) tandis que l'exposition la plus importante a été retrouvée dans le centre 142 (1,42 ± 2,26 mg/kg/j). Concernant le propylparabène, l'exposition la plus basse a également été retrouvée dans le centre 538 (0,04 ± 0,08 mg/kg/j) tandis que l'exposition la plus importante a également été retrouvée dans le centre 140 (0,23 ± 0,35 mg/kg/j).

Tableau 21: Valeurs d'expositions aux parabènes selon le centre d'inclusion (en mg/kg/j).

| Centre | MePb        | EtPb        | PrPb        |
|--------|-------------|-------------|-------------|
| 64     | 0,48 ± 0,67 | 0,22 ± 0,21 | 0,07 ± 0,10 |
| 96     | 0,94 ± 0,52 | 0,48 ± 0,24 | 0,11 ± 0,07 |
| 140    | 1,42 ± 2,26 | 0,14 ± 0,18 | 0,23 ± 0,35 |
| 179    | 0,68 ± 1,46 | 0,20 ± 0,18 | 0,10 ± 0,22 |
| 225    | 0,57 ± 0,53 | 0,35 ± 0,30 | 0,08 ± 0,07 |
| 245    | 0,68 ± 1,02 | 0,19 ± 0,18 | 0,10 ± 0,15 |
| 297    | 0,58 ± 0,49 | 0,21 ± 0,15 | 0,08 ± 0,07 |
| 319    | 0,42 ± 0,68 | 0,17 ± 0,23 | 0,06 ± 0,10 |
| 321    | 0,31 ± 0,29 | 0,06 ± 0,09 | 0,06 ± 0,06 |
| 337    | 0,84 ± 0,59 | 0,40 ± 0,24 | 0,10 ± 0,08 |
| 339    | 0,61 ± 0,43 | 0,35 ± 0,35 | 0,09 ± 0,06 |
| 389    | 0,92 ± 0,72 | 0,48 ± 0,42 | 0,12 ± 0,10 |
| 395    | 0,66 ± 0,92 | 0,09 ± 0,15 | 0,11 ± 0,14 |
| 408    | 0,84 ± 1,19 | 0,36 ± 0,44 | 0,13 ± 0,17 |
| 413    | 0,83 ± 1,06 | 0,13 ± 0,14 | 0,13 ± 0,16 |
| 433    | 1,30 ± 1,82 | 0,29 ± 0,33 | 0,19 ± 0,29 |
| 436    | 0,40 ± 0,35 | 0,23 ± 0,25 | 0,06 ± 0,06 |
| 439    | 0,55 ± 0,72 | 0,86 ± 0,98 | 0,08 ± 0,10 |
| 446    | 0,69 ± 0,83 | 0,24 ± 0,27 | 0,11 ± 0,14 |
| 454    | 0,47 ± 0,42 | 0,26 ± 0,24 | 0,06 ± 0,06 |
| 458    | 0,83 ± 1,09 | 0,24 ± 0,27 | 0,12 ± 0,16 |
| 493    | 0,59 ± 0,41 | 0,29 ± 0,17 | 0,07 ± 0,06 |
| 513    | 0,70 ± 0,85 | 0,22 ± 0,24 | 0,11 ± 0,13 |
| 537    | 0,54 ± 0,39 | 0,19 ± 0,26 | 0,10 ± 0,07 |
| 538    | 0,22 ± 0,41 | 0,08 ± 0,12 | 0,04 ± 0,08 |
| 547    | 0,62 ± 0,53 | 0,15 ± 0,20 | 0,10 ± 0,08 |
| 559    | 0,76 ± 1,03 | 0,20 ± 0,39 | 0,11 ± 0,16 |
| 566    | 0,28 ± 0,14 | 0,10 ± 0,11 | 0,05 ± 0,02 |
| 573    | 0,31 ± 0,25 | 0,13 ± 0,15 | 0,05 ± 0,04 |
| 574    | 0,55 ± 0,72 | 0,13 ± 0,13 | 0,09 ± 0,12 |
| 579    | 0,54 ± 0,51 | 0,22 ± 0,17 | 0,07 ± 0,08 |
| 580    | 0,55 ± 0,47 | 0,22 ± 0,24 | 0,08 ± 0,07 |
| 590    | 0,52 ± 0,65 | 0,35 ± 0,21 | 0,08 ± 0,10 |
| 591    | 0,83 ± 1,15 | 0,26 ± 0,29 | 0,12 ± 0,17 |
| 592    | 0,56 ± 0,78 | 0,25 ± 0,28 | 0,08 ± 0,12 |

L'analyse de la distribution des doses journalières moyennes de parabènes reçues par les nouveau-nés inclus souligne d'autant plus l'impact de l'âge gestationnel (Figure 12). Ainsi, des différences significatives ( $p < 0,05$ ) sont retrouvées entre tous les groupes pour le méthylparabène. Pour l'éthylparabène, seuls les prématurés de 28-31 SA et les prématurés de moins de 28 SA présentent des distributions équivalentes. Enfin, pour le propylparabène, les différences entre sous-groupes sont



moins présentes mais existent entre les nouveau-nés à terme et les prématurés de 32-36 SA, les prématurés de 32-36 SA et ceux de 28-31 SA, ainsi qu'entre les prématurés de 32-36 SA et ceux de moins de 28 SA.

Concernant l'analyse des distributions des doses journalières moyennes en fonction du poids de naissance, il n'y a pas de différence entre les groupes pour le méthylparabène. En revanche, il existe une différence significative pour le propylparabène et une différence très significative pour l'éthylparabène (Figure 13).

Pour les nouveau-nés inclus et exposés à au moins un médicament contenant des parabènes, le nombre moyen de jour d'exposition est détaillé dans le Tableau 22. Pour les 3 parabènes étudiés, le nombre moyen de jours d'exposition augmentait avec le niveau de prématurité. Par exemple, il était de 2,2 pour les nouveau-nés à terme et de 20 pour les nouveau-nés prématurés de moins de 28 SA.

*Tableau 22: Nombre moyen de jours d'exposition aux parabènes selon l'âge gestationnel*

|                     | <b>MePb</b> | <b>EtPb</b> | <b>PrPb</b> |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Tout patient</b> | 6,1 ± 11,7  | 1,8 ± 5,9   | 6,0 ± 11,6  |
| <b>&gt; 37</b>      | 2,2 ± 5,3   | 1,3 ± 4,0   | 2,2 ± 5,2   |
| <b>32-36</b>        | 5,0 ± 8,3   | 1,5 ± 4,8   | 5,0 ± 8,2   |
| <b>28-31</b>        | 15,0 ± 15,8 | 3,0 ± 8,3   | 14,9 ± 15,8 |
| <b>&lt;28</b>       | 20,0 ± 22,6 | 4,9 ± 11,8  | 19,6 ± 22,3 |

Figure 12: Distribution des doses journalières moyennes en parabènes selon l'âge gestationnel. A: Méthylparabène; B: Ethylparabène; C: Propylparabène

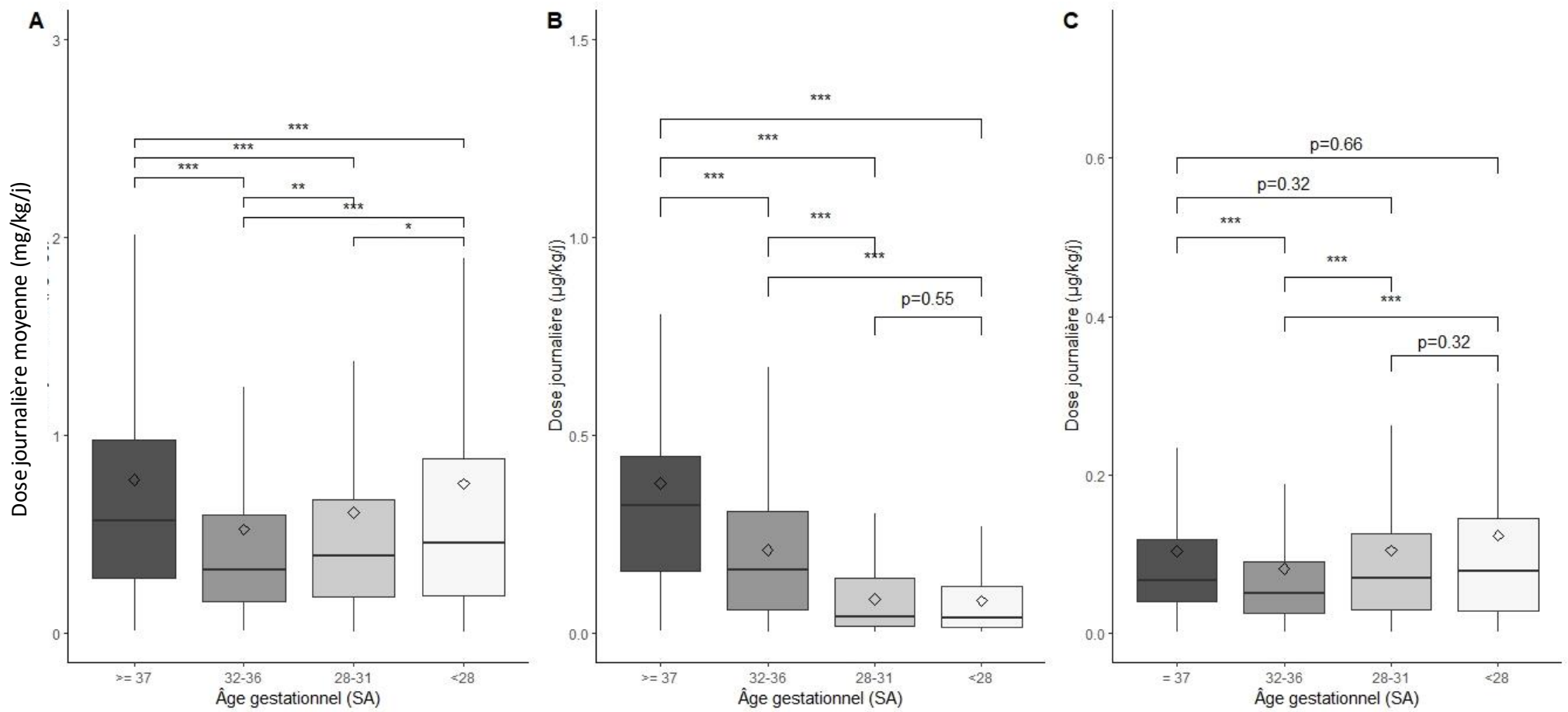
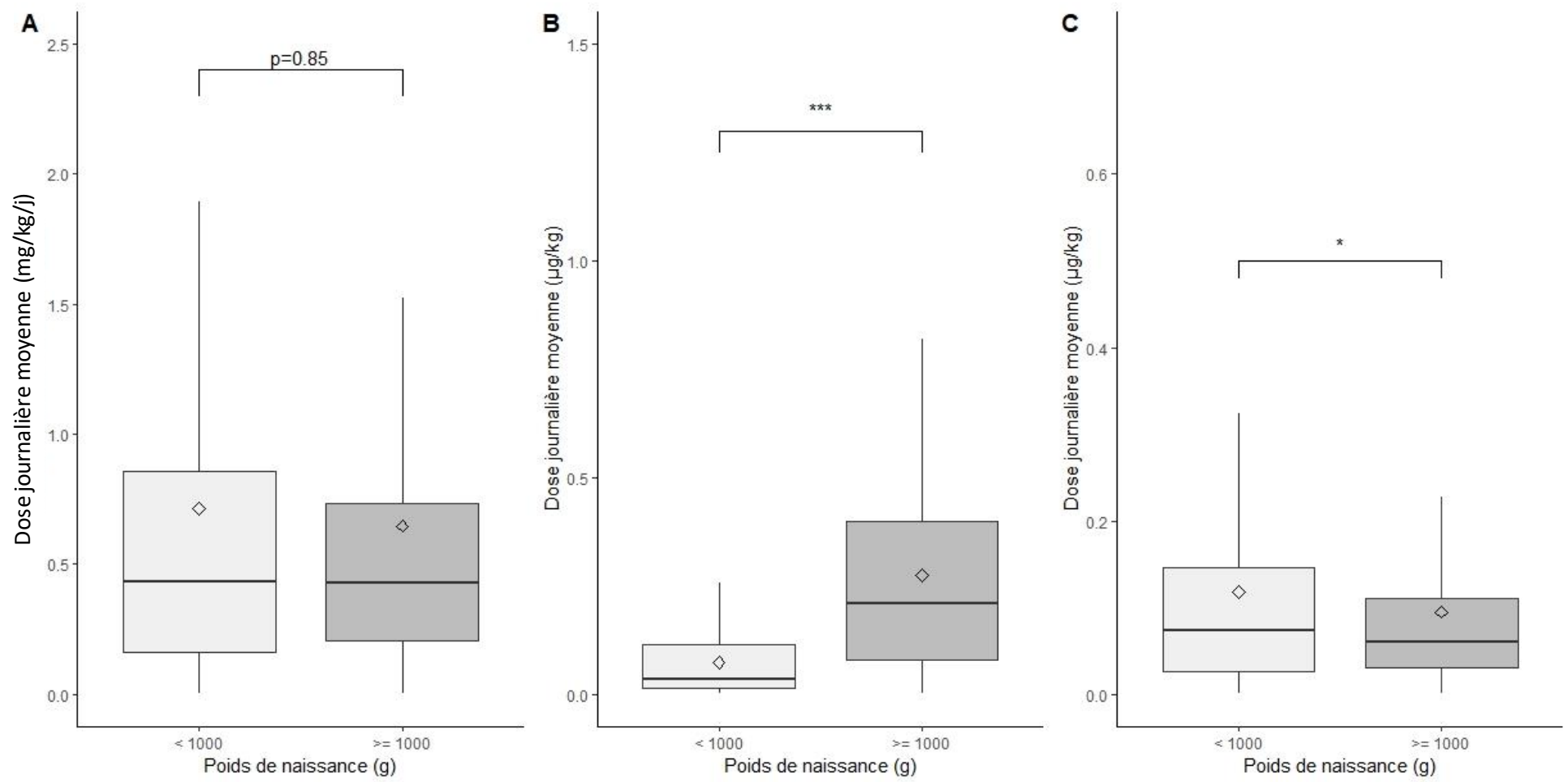


Figure 13: Distribution des doses journalières moyennes en parabènes selon le poids de naissance. A: Méthylparabène; B: Ethylparabène; C: Propylparabène



## 4. DISCUSSION

La population de nouveau-nés incluse dans cette étude est particulièrement représentative de ce qui existe sur le territoire national, à la fois en termes de géographie (métropole et départements d'outre-mer) mais également de type d'établissement d'inclusion. En effet, les 36 centres d'inclusions comprenaient des CHU ainsi que des CHR et CH, avec des maternités de niveau 2 et de niveau 3. Cette diversité géographique et de type a permis d'explorer une grande variété de prises en charge effectuées auprès des nouveau-nés hospitalisés après leur naissance.

Selon l'INSEE, 753000 naissances ont eu lieu en France en 2019 [184]. Parmi elles, 50000 à 60000 sont des naissances prématurées [183]. En incluant plus de 4000 nouveau-nés prématurés sur une période de 6 mois, notre étude a donc permis de couvrir de 13 à 16% des naissances prématurées ayant eu lieu pendant la période d'inclusion.

Notre étude démontre que les nouveau-nés hospitalisés après leur naissance reçoivent beaucoup de médicaments, dont certains contiennent des parabènes. Ces données sont en accord avec celles retrouvées par *Nellis et al.* dans une étude européenne [161]. Les auteurs avaient retrouvé 246 DCI différentes pouvant être utilisées chez les nouveau-nés hospitalisés, à mettre en relation avec les 287 DCI identifiées dans notre étude. Dans d'autres études, le nombre de DCI prescrites dans cette population était plus faible, de 70 jusqu'à 101. Cette différence peut être expliquée par le caractère monocentrique et rétrospectif de ces études [158–160]. Nous avons identifié que 4% des spécialités pharmaceutiques commercialisées en France contiennent des parabènes mais ces médicaments représentent plus de 10% de ceux prescrits dans notre étude. Ce ratio correspond à celui entre le nombre de lignes de prescriptions contenant des parabènes et le nombre de lignes de prescriptions total (11,9%). Aussi, ce nombre élevé de médicaments contenant des parabènes et les prescriptions associées démontrent que cette population est particulièrement exposée via la prise en charge thérapeutique mise en œuvre chez ces enfants.

Dans notre étude, la majorité (57,2%) des nouveau-nés inclus ont été exposés au moins une fois à un médicament contenant des parabènes avec une augmentation de cette prévalence en fonction de l'âge gestationnel à la naissance. Ainsi, les nouveau-nés prématurés de moins de 28 SA étaient largement plus exposés que les nouveau-nés à terme. Ces prévalences d'exposition sont plus importantes que celles observées dans l'étude de *Nellis et al.* où 43% des nouveau-nés avaient été exposés aux parabènes [161]. En revanche, l'augmentation de la prévalence avec la diminution de l'âge gestationnel y est également retrouvée. Cette différence de prévalence d'exposition pourrait être due à des différences de pratiques entre la France et d'autres pays européens participant à l'étude de *Nellis*

*et al.*. En effet, cette étude porte sur une population recrutée dans plusieurs pays européens, dont la France, démontrant ainsi une prise en charge globale plus exposante aux parabènes en France. Les données retrouvées dans l'étude de *Souza et al.*, avec une prévalence d'exposition de 60,7%, sont similaires à nos résultats [159]. Toutefois, ces auteurs ne se sont pas intéressés aux différences de prévalence en fonction de l'âge gestationnel à la naissance.

Ces prévalences d'exposition démontrent que l'âge gestationnel à la naissance est un facteur de risque important dans l'exposition des nouveau-nés aux parabènes via l'administration des médicaments. Ainsi, un très grand prématuré (moins de 28 SA) aura 2 fois plus de risque d'être exposé qu'un nouveau-né à terme. De plus, le nombre de jours moyens d'exposition aux parabènes est également relié à ce facteur puisqu'un nouveau-né prématurés de moins de 28 SA sera exposé 3 fois plus longtemps par rapport à un nouveau-né à terme.

Concernant la quantification de cette exposition aux parabènes, elle est en accord à ce qui est retrouvé dans l'étude de *Mulla et al.*, c'est-à-dire une exposition de  $0,58 \pm 0,31$  mg/kg et  $0,14 \pm 0,10$  mg/kg pour le méthyle et le propylparabène respectivement [162]. Néanmoins, cette étude n'a pas comparé les doses journalières moyennes reçues en fonction de l'âge gestationnel à la naissance. Notre étude montre que les quantités journalières moyennes reçues par les nouveau-nés inclus ne varient de la même façon que les fréquences d'exposition. Ainsi, pour le méthyle et le propylparabène, les nouveau-nés à terme et les nouveau-nés prématurés de moins de 28 SA sont plus exposés que les 2 autres groupes. En revanche, pour l'éthylparabène, les nouveau-nés à terme sont les plus exposés tandis que la quantité journalière reçue diminue en fonction de l'âge gestationnel à la naissance. Ces données soulignent donc le fait que ces quantités d'exposition sont moins dépendantes de l'âge, excepté pour l'éthylparabène.

Toutefois, ces taux sont non négligeables. S'il n'existe pas à l'heure actuelle d'estimation de l'exposition aux parabènes via les médicaments dans la population générale, il est démontré que les concentrations plasmatiques en parabènes des nouveau-nés hospitalisés sont plus importantes que chez l'adulte. En effet, la concentration médiane en méthylparabène dans une cohorte de nouveau-né était de 13,0 ng/mL, soit environ dix fois les taux mesurés dans le plasma d'adulte sains (1,57 ng/mL). Un ratio plus important est également retrouvé pour le propylparabène [162,163]. Par ailleurs, ces taux sont bien supérieurs à ceux retrouvés sur sang de cordon à la naissance (2,2 et 0,3 ng/mL en médiane, pour le méthyle et le propylparabène respectivement) [164]. Ces éléments soulignent que les nouveau-nés sont plus exposés que la population générale aux parabènes et on peut faire l'hypothèse que les quantités journalières moyennes apportées par les médicaments ont un rôle non négligeable dans cette exposition.

Enfin, le nombre moyen de jours d'exposition aux parabènes est cohérent avec les valeurs retrouvées concernant la fréquence d'exposition. En effet, ce nombre est directement relié au niveau de prématurité des nouveau-nés inclus, avec une augmentation significative selon l'âge gestationnel à la naissance. De plus, si les différences d'exposition entre les groupes d'âge sont moins importantes en termes de quantités moyennes journalières, les nouveau-nés prématurités sont beaucoup plus à risque d'être exposés à ces perturbateurs endocriniens en termes de fréquence et avec une durée d'exposition beaucoup plus longue.

Notre étude montre également des différences d'exposition aux parabènes importantes en fonction des différents centres d'inclusion. Sur les 30 médicaments contenant des parabènes prescrits dans l'étude, certains sont utilisés dans la majorité des centres, voire par tous les centres pour une spécialité (Doliprane® 2,4%), tandis que d'autres sont prescrits uniquement dans un nombre restreint d'établissements. Cela souligne que les variations d'expositions observées peuvent être attribuables aux pratiques des centres dans lesquels naissent les nouveau-nés. Ainsi, un nouveau-né inclus dans le centre 11 sera beaucoup plus à risque d'être exposés aux parabènes contenus dans le Ferrostrane® que les nouveau-nés inclus dans le centre 1. Ces variations d'exposition peuvent être dues à des spécificités de prise en charge entre les centres. Tous les centres n'accueillant pas forcément les mêmes types de nouveau-nés (niveau de prématurité, indications). De plus, pour une même indication, les prises en charge thérapeutiques peuvent varier d'un centre à un autre et peuvent donc être plus ou moins exposantes aux parabènes via l'administration des médicaments.

Notre étude présente un certain nombre de limites. Premièrement, les indications pour lesquels les médicaments sont prescrits ne sont pas disponibles. En effet, le logiciel Logipren® ne permet pas de recueillir les indications de prescription et n'est pas non plus relié au système PMSI de chaque hôpital. Nous n'avons donc pas pu déterminer si les différences d'utilisation des médicaments entre les centres étaient dues à des pratiques différents ou au type de nouveau-nés hospitalisés. De même, notre étude ne s'est intéressée qu'aux nouveau-nés hospitalisés. Même si ces derniers sont plus susceptibles de recevoir des médicaments étant donné les pathologies qui les caractérisent, les nouveau-nés non hospitalisés peuvent également recevoir des médicaments. Les résultats de notre étude ne peuvent donc pas être étendus à la population pédiatrique de façon générale.

## **5. CONCLUSION**

Notre étude apporte des données substantielles concernant l'exposition des nouveau-nés aux parabènes via l'administration des médicaments. La prise en charge thérapeutique des nouveau-nés

sur le territoire français expose les nouveau-nés de façon conséquente, avec des variations significatives en fonction de l'âge gestationnel, à la fois en termes de quantité, de prévalence et de durée. Ces données doivent inciter les autorités sanitaires nationales et européennes, à réguler plus strictement l'utilisation des parabènes dans les médicaments, notamment pour les spécialités susceptibles d'être utilisées dans cette population. Il est également nécessaire de s'interroger sur les pratiques actuelles de prise en charge et de rechercher des alternatives thérapeutiques aux situations exposantes aux parabènes. Cette recherche d'alternatives sera évaluée dans le chapitre suivant.

**Annexe 1 : liste des centres d'inclusion ayant participé à l'étude**

|  |
|--|
| GROUPE HOSPITALIER CAREMEAU CHU NIMES  |
| CH CHATEAURoux                         |
| CHR ORLEANS - HÔPITAL MADELEINE        |
| CENTRE HOSPITALIER PUBLIC DU COTENTIN  |
| HOPITAL JEANNE DE FLANDRE CHR LILLE    |
| CH ARRAS                               |
| CH LENS                                |
| C.H.I.C. COTE BASQUE - BAYONNE         |
| CENTRE HOSPITALIER DE PAU              |
| CH LES CHANAUX MACON                   |
| CH DE CHAMBÉRY                         |
| GPE HOSP SAINT-JOSEPH                  |
| HOPITAL NECKER ENFANTS MALADES (AP-HP) |
| HOPITAL JACQUES MONOD CH LE HAVRE      |
| CENTRE HOSPITALIER M JACQUET MELUN     |
| C.H. DE MEAUX                          |
| CHI POISSY ST-GERMAIN SITE DE POISSY   |
| CENTRE HOSPITAL. GEORGES RENON         |
| CHU AMIENS NORD                        |
| CHU POITIERS                           |
| CH SUD FRANCILIEN SITE JEAN JAURES     |
| CTRE HOSP INTERCOMM ANDRE GREGOIRE     |
| CH GENERAL DELAFONTAINE SAINT DENIS    |
| CHI DE CRETEIL                         |
| CENTRE HOSPITALIER RENE DUBOS          |
| C.H.U. DE POINTE-A-PITRE/ABYMES        |
| CHU DE MARTINIQUE SITE MERE ENFANT     |
| CENTRE HOSPITALIER DE CAYENNE          |
| CHU LA REUNION SITE NORD               |
| CHU LA REUNION SITE SUD                |
| CH MAYOTTE                             |
| CHT NOUMEA                             |
| CENTRE HOSPITALIER OUEST GUYANAIS      |
| CHU COTE DE NACRE - CAEN               |
| CHP DE ST BRIEUC - SITE STE THERESE    |



## **CHAPITRE 2 : METHODES DE DOSAGES ULTRASENSIBLES PERMETTANT LA QUANTIFICATION DES PARABENES DANS LE PLASMA**

### **1. CONTEXTE**

Comme démontré dans les deux chapitres précédents, les nouveau-nés hospitalisés sont exposés aux parabènes via les médicaments qui leur sont administrés durant l'hospitalisation qui fait suite à leur naissance. Cette exposition concerne l'ensemble des nouveau-nés, qu'ils soient nés à terme ou prématurément [162]. Néanmoins, cette population peut également être exposée à ces composés via d'autres sources, tels que les produits cosmétiques, l'alimentation ou encore par le lait maternel [83,185]. De plus, la majorité de cette exposition se fait avec une association de 2 molécules, suggérant la possibilité d'un effet cocktail potentiellement préjudiciable [17,37,40]. Il est donc nécessaire de pouvoir évaluer la part attribuable aux médicaments dans cette exposition afin de déterminer son impact sur les concentrations plasmatiques en parabènes des nouveau-nés en comparaison des autres sources. Cette détermination permettra de mieux caractériser l'exposition globale des nouveau-nés aux parabènes [181].

Pour cela, il est essentiel de mettre au point une méthode de dosage permettant de doser chez les nouveau-nés les différents parabènes (méthyle, éthyle, propyle et butylparabène), à la fois de façon fiable, ultrasensible et sur une matrice adaptée. Deux principales matrices biologiques sont disponibles chez le nouveau-né : urines et plasma. Toutefois, les urines ne permettent pas de déterminer efficacement si les médicaments contenant des parabènes modifient l'exposition de cette population. En effet, si des parabènes sont retrouvés dans les urines de nouveau-nés [173,186,187], ils ont préalablement subi une phase de métabolisme et d'excrétion [127,128]. Or, chez les nouveau-nés, et d'autant plus chez les nouveau-nés prématurés, le métabolisme des parabènes n'est pas parfaitement connu étant donné l'imaturité de cette phase pharmacocinétique dans cette population [80], ne permettant pas d'établir un lien entre quantification urinaire et exposition plasmatique aux parabènes. De plus, la plupart des méthodes de dosage urinaire font appel à des méthodes de déconjugaison enzymatique permettant de transformer les métabolites conjugués en composés parents. Ces méthodes de dosage, qualifiées d'indirecte, portent donc à la fois sur les composés parents et leurs métabolites conjugués. Or, il existe plusieurs méthodes de déconjugaison différentes qui ne sont pas équivalentes entre elles. De plus, la mesure du composé « total » (parent + métabolites déconjugés) ne donnent pas systématiquement les mêmes résultats que la somme du composé parent et de ses métabolites mesurés de façon directe [129]. L'utilisation de ces méthodes de déconjugaison peut donc

provoquer des variations de mesures, non pas imputables aux différences d'exposition mais aux techniques employées.

Enfin, le recueil des urines chez le nouveau-né est plus compliqué que chez l'adulte et doit faire appel à des techniques complexes pour forcer l'enfant à uriner ou à des techniques permettant de recueillir les urines directement au niveau des couches [89,90,188].

A l'heure actuelle, seulement 2 méthodes de dosages dans le sang ont été décrites dans la littérature pour réaliser cette quantification dans cette population [162,189]. Néanmoins, ces techniques souffrent de certaines limites rendant difficile leur application chez les nouveau-nés prématurés. En effet, le volume de prélèvement qu'elles imposent est important pour un prématuré, notamment dans le cadre d'une étude observationnelle. De plus, leurs limites de quantification sont élevées, risquant de ne pas permettre une évaluation efficace de la modification des concentrations plasmatiques en parabènes après administration de médicaments.

Considérant tous ces éléments, cette partie de nos travaux a pour but de mettre au point et valider une méthode de dosage analytique permettant de quantifier de faibles quantités de parabènes dans le sang, avec de faibles volumes de prélèvement.

## **2. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1. Produits chimiques et réactifs**

Le méthylparabène, l'éthylparabène, le propylparabène et le butylparabène ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Les étalons internes (D4-méthylparabène, D5-éthylparabène, D7-propylparabène, D9-butylparabène) ont été achetés chez LGC Standards (Molsheim, France). L'ensemble des composés avait une pureté supérieure à 99%. L'acétonitrile, le méthanol et l'eau ultrapure étaient de grade UPLC-MS et ont été achetés chez Carlo-Erba (Val de Reuil, France).

### **2.2. Préparation des solutions**

La solution de rinçage était composée d'un mélange d'eau ultrapure et de méthanol avec un ratio de 95/5 (v/v). La solution d'élution était composée d'un mélange de méthanol et d'acétonitrile avec un ratio de 50/50 (v/v). Enfin, la solution de reprise était composée d'un mélange d'eau ultrapure et d'acétonitrile avec un ratio de 70/30 (v/v).

### 2.3. Préparation des réactifs et des solutions standards

Pour chaque parabène et son étalon interne deutéré, les solutions de stockage ont été préparées par dissolution des poudres dans du méthanol pour obtenir la concentration de 1 mg/mL. Les solutions de stockage étaient ensuite conservées à -20°C. La stabilité des parabènes dans ces conditions a été démontrée dans une précédente étude [190].

Les solutions standards de parabènes ont été obtenues par dilution de la solution de stockage avec du méthanol pour obtenir une solution fille (SF<sub>p</sub>) à une concentration de 3,2 µg/mL. Cette solution fille a ensuite été diluée avec de l'eau pour obtenir des solutions standards ayant les concentrations suivantes : 16 – 8 – 4 – 2 – 1 – 0,5 – 0,25 ng/mL. Le même procédé a été appliqué pour obtenir une solution standard d'étalons internes à une concentration de 16 ng/mL. Les solutions standards ont été préparées extemporanément.

### 2.4. Préparation des échantillons

En raison d'une contamination importante en méthylparabène du plasma humain, nous avons utilisé une matrice synthétique pour la préparation des blancs, des points de gamme et des contrôles qualité. Le plasma synthétique a été préparé selon la littérature, sa formule est détaillée dans le Tableau 23.

Tableau 23: Composition de la matrice plasmatique synthétique utilisée

| Composant              | Concentration |
|------------------------|---------------|
| Albumine humaine       | 40 g/L        |
| Chlorure de sodium     | 8 g/L         |
| Chlorure de potassium  | 0,2 g/L       |
| Phosphate de sodium    | 1,44 g/L      |
| Phosphate de potassium | 0,24 g/L      |
| Acide chlorhydrique    | Qsp pH 7,4    |

Cinquante microlitres de plasma synthétique (ou de plasma d'enfants prématurés) ont été surchargés avec 10 µL de la solution standard d'étalon interne et 10 µL de solution standard de parabènes. Les échantillons ont ensuite été agités au vortex et 70 µL de la solution d'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à 4% ont été ajoutés. Après agitation au vortex, une extraction solide/liquide a été effectuée par dépôt de 100µL des solutions

obtenues dans les puits de la plaque de microéluion Oasis HLB (Waters, Milford, USA). Les solutions ont été aspirées par une dépression d'environ 0,1 bar afin de charger les échantillons sur la plaque. Les puits ont ensuite été rincés par 2 passages successifs de 100 µL de la solution de rinçage. L'éluion des échantillons a été réalisée par 2 passages successifs de 50 µL de la solution d'éluion. Les éluats ont été évaporés sous un léger flux d'azote puis resolubilisés par 100µL de la solution de reprise. Dix microlitres ont ensuite été injectés dans le système UHPLC-MS/MS.

Les points de gamme de calibration s'étendaient de 0,025 à 3,2 ng/mL. Les concentrations des contrôles qualités étaient de 0,025 (Contrôle qualité bas, CQB), 0,2 (Contrôle qualité intermédiaire, CQI) et 3,2 ng/mL (Contrôle qualité haut, CQH). Les points de contrôles ont été préparés de la même façon que les points de gamme de calibration mais à partir d'une solution fille spécifiquement réalisée à cet usage.

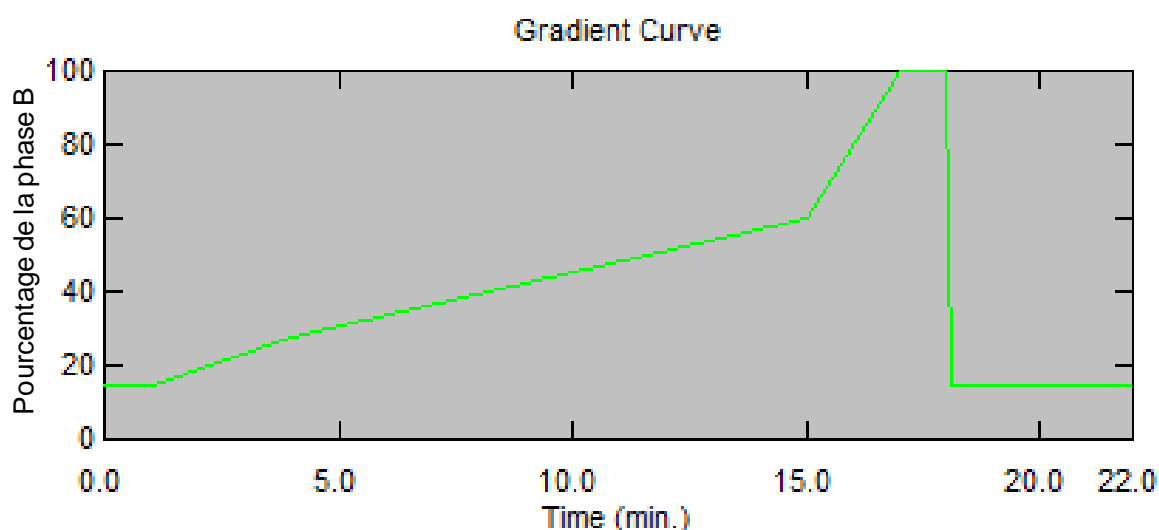
Pour chaque série de manipulations, cinq blancs matrices étaient réalisés en remplaçant la surcharge de parabènes par 10 µL d'eau ultrapure ainsi qu'un double blanc (sans surcharge en parabènes, ni en étalon interne) et un blanc eau (pas de matrice, ni surcharge en parabènes et en étalon interne).

## **2.5. Analyse par UHPLC-MS/MS**

### **2.5.1. Séparation des composés**

Le système UHPLC employé était composé d'un module chromatographique Shimadzu® Nexera X2 (Kyoto, Japon) associé à une colonne chromatographique BEH C18 (3,5 µm, 2,1x100 mm, Waters, Milford, USA), maintenue à une température de 40°C. La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'un gradient de phase mobile. Les phases mobiles étaient composées d'eau ultrapure (phase A) et d'acétonitrile (phase B) délivrées à un débit de 0,35 mL/min. Le gradient d'éluion commençait à 15% de la phase B (0-1 min) ; suivi d'une augmentation linéaire jusqu'à atteindre 28% de la phase B (1-4 min) ; puis d'une seconde augmentation linéaire pour atteindre 60% de la phase B (4-15 min) ; d'une troisième augmentation linéaire pour atteindre 100% de la phase B (15-17 min) puis d'un plateau à 100% de la phase B (17-18 min) ; suivi d'un retour à 15% de la phase B (18-18,1 min) pour rééquilibrer la colonne jusqu'à la fin du run analytique (18,1-22 min) (Figure 14).

Figure 14: Gradient d'élution utilisé pour la séparation chromatographique



### 2.5.2. Spectrométrie de masse

La quantification des parabènes a été réalisée sur un spectromètre de masse API6500+ (Sciex, Concord, Canada) en mode ESI (Electrospray ionization) négatif. Les paramètres de la source et les conditions spectrométriques ont été optimisés par une infusion d'une solution à 1 µg/mL de chaque analyte à un débit de 10 µL/min. Pour chacun des composés analysés, la détection et la quantification a été réalisée en mode MRM (Multiple Monitoring Monitoring) par le suivi de deux transitions spécifiques ion parent – ion fils. La première transition était utilisée pour la quantification, la deuxième pour la confirmation du composé. Divers paramètres tels que le dwell time ou le nombre de cycles ont été optimisés en utilisant l'algorithme fourni par le fabricant du spectromètre. L'acquisition a été réalisée à l'aide du logiciel Analyst® et la quantification à l'aide du logiciel MultiQuant®.

## 2.6. Validation de la méthode

La validation de la méthode analytique a été réalisée en accord avec les recommandations de l'EMA et de la FDA [191,192]. Pour chacun des composés, les paramètres suivants ont été explorés : sélectivité, linéarité de la courbe de calibration, exactitude, précision, limite basse de quantification (LLOQ, Lower Limit Of Quantification), limite de détection (LOD, Limit Of Detection) et effets matrices.

Pour étudier la sélectivité de la méthode pour chaque parabène et son étalon interne, leur signal au temps de rétention a été comparé à des chromatogrammes issus de blanc matrices. La sélectivité étant considérée comme acceptable en absence de pics détectable aux temps de rétention des analytes dans les blancs matrices.

Pour la linéarité, cinq gammes de calibration ont été réalisées. Pour chacune, le coefficient de détermination ( $r^2$ ), la pente, l'ordonnée à l'origine et les résidus ont été calculés. Une courbe étant considérée comme linéaire si le coefficient de détermination était supérieur à 0,99 et les résidus inférieurs à 15% pour chaque point de gamme (20% pour le point le plus bas).

L'exactitude et la précision intra- et inter-day ont été déterminées à l'aides de contrôles qualité. La méthode était considérée comme exacte si les taux de recouvrement étaient compris dans un intervalle de 85 à 115% autour de la valeur-cible ; et précise si les coefficients de variations étaient inférieurs à 15% (20% pour le contrôle qualité bas).

Rendements d'extraction, effets matrices et efficacité globale de la méthode ont également été évalués simultanément [193]. Pour cela, trois séries d'échantillons ont été réalisées selon le protocole suivant :

- La première série d'échantillons (série A) a été obtenue par extraction de plasma synthétique surchargés en analytes aux niveaux de concentrations correspondant aux contrôles qualité intermédiaire et haut (0,2 et 3,2 ng/mL) ;
- La deuxième série (série B) a été obtenue par surcharge, aux mêmes niveaux de concentrations, de plasma synthétique préalablement extraits ;
- Enfin, la troisième série (série C) a été obtenue par surcharge en analytes, aux mêmes niveaux de concentrations, dans le solvant d'extraction, sans matrice, ni extraction. Le signal obtenu pour cette série représente la référence avec un rendement de 100% et sans effet matrice.

A partir de ces 3 séries seront calculés le rendement d'extraction, les effets matrices et l'efficacité globale de la méthode pour les 4 parabènes, selon les formules suivantes :

- Rendement d'extraction :  $A/B \times 100$
- Effet matrice :  $B/C \times 100$
- Efficacité globale :  $A/C \times 100$

La LOD a été déterminée comme 3 fois l'écart-type du signal obtenu au temps de rétention des composés lors de l'analyse de 5 blancs matrice synthétique. La LLOQ a été définie comme le plus petit point de la gamme pour lequel les paramètres analytiques de validation (exactitude, précision) étaient dans les valeurs attendues.

## **2.7. Applicabilité de la méthode**

Dix-sept échantillons de plasma, issus de nouveau-nés hospitalisés au CHU de Poitiers, ont été récupérés suite aux prélèvements réalisés dans la pratique courante des soins. Pour vérifier l'applicabilité de la méthode, ces échantillons ont été extraits et analysés selon la même procédure que pour les points de gamme mais en remplaçant la solution standard par 10 µL d'eau ultrapure.

## **3. RESULTATS**

### **3.1. Conditions de spectrométrie**

Comme décrit précédemment, le détecteur MS/MS était couplé à une source d'ionisation ESI (ElectroSpray Ionisation) en mode négatif. Les conditions optimisées de la source étaient les suivantes : température à 600°C, pression du gaz rideau à 30 psi, pression des gaz de désolvatation à 50 et 60 psi et potentiel du capillaire -4,5 kV.

Les transitions spécifiques des parabènes parents et les paramètres spectrométriques sont présentés dans le Tableau 24. Le dwell time était de 20 ms et la durée d'un cycle de 0,4 seconde (soit 3300 cycles par run).

Tableau 24: Paramètres spectrométriques des parabènes

| Composé        | Temps de rétention (min) | Transition MRM (m/z) | Tension de cône (V) | Energie de collision (V) |
|----------------|--------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|
| <b>MePb</b>    | 7,26                     | 150,9 – 91,7         | -30                 | -26                      |
|                |                          | 150,9 – 135,7        | -30                 | -18                      |
| <b>MePb-D4</b> | 7,22                     | 154,9 – 95,9         | -40                 | -28                      |
|                |                          | 154,9 – 139,8        | -40                 | -20                      |
| <b>EtPb</b>    | 9,19                     | 164,9 – 91,7         | -35                 | -30                      |
|                |                          | 164,9 – 136,7        | -35                 | -20                      |
| <b>EtPb-D5</b> | 9,13                     | 169,9 – 91,8         | -40                 | -30                      |
|                |                          | 169,9 – 137,7        | -40                 | -20                      |
| <b>PrPb</b>    | 11,38                    | 178,9 – 91,8         | -50                 | -30                      |
|                |                          | 178,9 – 136,3        | -50                 | -20                      |
| <b>PrPb-D7</b> | 11,24                    | 185,9 – 91,8         | -55                 | -30                      |
|                |                          | 185,9 – 135,7        | -55                 | -22                      |
| <b>BuPb</b>    | 13,46                    | 192,9 – 91,8         | -60                 | -30                      |
|                |                          | 192,9 – 136,3        | -60                 | -22                      |
| <b>BuPb-D9</b> | 13,29                    | 202,0 – 91,8         | -55                 | -32                      |
|                |                          | 202,0 – 135,7        | -55                 | -24                      |

### 3.2. Validation de la méthode

Aucun pic chromatographique significatif n'a été observé aux temps de rétention des analytes dans le blanc matrice, démontrant ainsi la spécificité de la méthode. Un léger pic de méthylparabène était présent en raison d'une contamination basale des solvants avec ce composé ubiquitaire. La linéarité de la méthode a été démontrée sur l'ensemble de la gamme de calibration avec des coefficients de détermination tous supérieurs à 0,99 (Tableau 25).



Tableau 25: Résumé des coefficients de détermination, pentes et ordonnées à l'origine des droites de calibration préparées avec le plasma synthétique (n=5)

| Composé  | MePb          | EtPb          | PrPb          | BuPb          |
|--|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Coefficient de détermination (moyenne ± écart-type)</b> | 0,997 ± 0,002 | 0,996 ± 0,003 | 0,996 ± 0,002 | 0,996 ± 0,001 |
| <b>Pente (moyenne ± écart-type)</b>                        | 0,223 ± 0,025 | 0,238 ± 0,028 | 0,317 ± 0,020 | 0,273 ± 0,027 |
| <b>Ordonnée à l'origine (moyenne ± écart-type)</b>         | 0,076 ± 0,002 | 0,031 ± 0,012 | 0,036 ± 0,006 | 0,017 ± 0,005 |

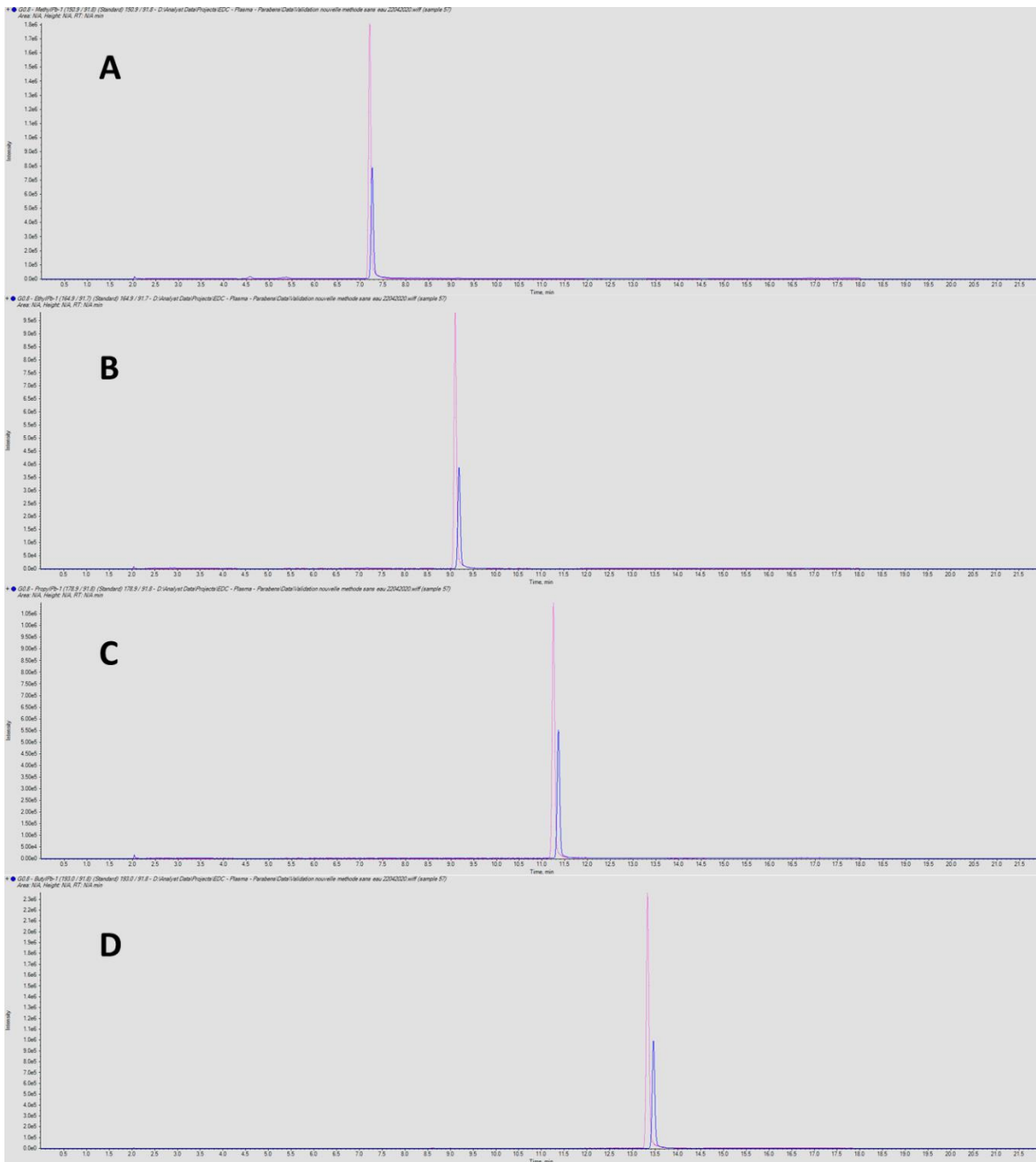
L'exactitude et la précision de la méthode ont été démontrées pour les 4 parabènes sur l'étendue de la gamme de calibration (Tableau 26). Le recouvrement était toujours compris dans l'intervalle 91,37-109,34% tandis que le plus grand coefficient de variation pour la précision était de 9,17%, ce qui correspond aux recommandations pour la validation des méthodes analytiques. Pour les 4 composés, la LOQ a été validée à 0,025 ng/mL, avec une bonne exactitude et précision (Tableau 26).

Tableau 26: Exactitude et précision intra- et interday de chaque analyte dans la matrice plasma synthétique (n=5)

| Composé     | Concentration (ng/mL) | Exactitude (IC95%) |                  | Précision (Coefficient de variation, %) |          |
|-------------|-----------------------|--------------------|------------------|---|----------|
|             |                       | Intraday           | Interday         | Intraday                                | Interday |
| <b>MePb</b> | 0,025 (LOQ)           | [84,96 ; 106,62]   | [91,13 ; 108,86] | 6,19                                    | 9,59     |
|             | 0,2                   | [95,09 ; 104,94]   | [95,65 ; 102,78] | 2,76                                    | 3,88     |
|             | 3,2                   | [92,45 ; 97,12]    | [91,30 ; 106,07] | 6,73                                    | 8,09     |
| <b>EtPb</b> | 0,025 (LOQ)           | [86,33 ; 95,35]    | [88,66 ; 98,57]  | 2,79                                    | 5,72     |
|             | 0,2                   | [93,45 ; 98,83]    | [95,55 ; 100,86] | 1,58                                    | 2,92     |
|             | 3,2                   | [84,05 ; 104,02]   | [96,62 ; 104,05] | 5,83                                    | 3,99     |
| <b>PrPb</b> | 0,025 (LOQ)           | [88,76 ; 106,95]   | [95,56 ; 105,22] | 5,13                                    | 5,19     |
|             | 0,2                   | [85,86 ; 96,55]    | [96,11 ; 106,86] | 7,23                                    | 5,72     |
|             | 3,2                   | [90,81 ; 107,83]   | [95,82 ; 109,65] | 4,74                                    | 7,27     |
| <b>BuPb</b> | 0,025 (LOQ)           | [86,02 ; 102,22]   | [87,34 ; 103,63] | 1,50                                    | 9,22     |
|             | 0,2                   | [95,69 ; 107,39]   | [97,81 ; 105,89] | 3,22                                    | 4,28     |
|             | 3,2                   | [99,13 ; 115,57]   | [99,13 ; 112,06] | 4,25                                    | 6,62     |

Un exemple de chromatogramme de chacun des 4 parabènes analysés est présenté en Figure 15.

Figure 15: Exemple de chromatogramme obtenu pour les quatre parabènes (bleu) et leur étalon interne (rose).  
 A: Méthylparabène; B: Ethylparabène; C: Propylparabène; D: Butylparabène



Concernant l'évaluation des rendements d'extraction, des effets matrices et de l'efficacité globale de la méthode, les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 27.

Tableau 27: Rendements, effets matrices et recouvrements de l'extraction des parabènes, avec correction par leur étalon interne, dans le plasma synthétique (%)

|             | Concentration (ng/mL) |       |       |      |      |       |
|-------------|-----------------------|-------|-------|------|------|-------|
|             | 0,2                   |       |       | 3,2  |      |       |
|             | Rdt                   | EM    | Eff   | Rdt  | EM   | Eff   |
| <b>MePb</b> | 115,7                 | 125,4 | 108,4 | 84,5 | 89,0 | 105,3 |
| <b>EtPb</b> | 102,7                 | 102,4 | 99,7  | 95,7 | 98,7 | 103,2 |
| <b>PrPb</b> | 93,1                  | 98,2  | 105,4 | 94,4 | 92,2 | 97,7  |
| <b>BuPb</b> | 101,6                 | 104,1 | 102,4 | 96,2 | 93,4 | 97,1  |

Rdt : rendement ; EM : effets matrice ; Eff : efficacité globale

### 3.3. Application de la méthode

Les résultats des dosages réalisés sur les échantillons de plasma issus de nouveau-nés sont présentés dans le Tableau 28.

La LOD déterminée durant cette analyse était de  $8,87 \cdot 10^5$ ,  $2,65 \cdot 10^5$ ,  $6,12 \cdot 10^5$  et  $1,88 \cdot 10^6$  en AUC, pour le méthyle, l'éthyle, le propyle et le butylparabène respectivement.

Tableau 28: Concentrations plasmatiques en parabènes obtenues durant l'essai d'applicabilité de la méthode

|                   | MePb (ng/mL) | EtPb (ng/mL) | PrPb (ng/mL) | BuPb (ng/mL) |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>1</b>          | 2,2242       | 0,0294       | 0,071        | < LOQ        |
| <b>2</b>          | 6,8371       | 0,3092       | 0,29         | 0,0361       |
| <b>3</b>          | 0,6142       | < LOD        | 0,0863       | < LOQ        |
| <b>4</b>          | 0,9776       | < LOQ        | < LOQ        | < LOQ        |
| <b>5</b>          | 1,0162       | < LOD        | 0,0562       | 0,0389       |
| <b>6</b>          | 0,801        | < LOQ        | < LOQ        | < LOQ        |
| <b>7</b>          | 0,8815       | < LOQ        | < LOQ        | < LOQ        |
| <b>8</b>          | 2,2065       | < LOQ        | 0,0971       | < LOQ        |
| <b>9</b>          | 12,2085      | 1,8312       | 0,0853       | < LOQ        |
| <b>10</b>         | < LOQ        | 0,0901       | 0,1037       | 0,047        |
| <b>11</b>         | 21,4049      | 1,666        | 0,9001       | < LOQ        |
| <b>12</b>         | 2,0237       | < LOQ        | 0,0457       | < LOQ        |
| <b>13</b>         | < LOQ        | < LOQ        | 0,0708       | < LOQ        |
| <b>14</b>         | 2,3101       | 0,0894       | 0,1739       | < LOQ        |
| <b>15</b>         | 0,5683       | 0,2121       | 0,1054       | < LOQ        |
| <b>16</b>         | < LOQ        | < LOQ        | 0,0682       | < LOQ        |
| <b>17</b>         | 0,5466       | 0,0593       | < LOQ        | < LOQ        |
| <b>Moyenne</b>    | 3,90         | 0,43         | 0,14         | 0,04         |
| <b>Ecart-type</b> | 5,98         | 0,70         | 0,22         | 0,01         |

Pour le méthylparabène et le propylparabène, seulement 3 échantillons de plasma présentaient des valeurs inférieures à la LOQ mais supérieures à la LOD. Pour l'éthylparabène, 7 échantillons étaient inférieurs à la LOQ et un était inférieur à la LOD. Pour le butylparabène, 14 échantillons étaient inférieurs à la LOQ.

#### **4. DISCUSSION**

Une méthode de dosage ultrasensible des parabènes dans le plasma a été développée et validée selon les guides de validation analytique applicables en santé [191,192]. Les performances de la méthode ont été démontrées par l'étude de l'ensemble des paramètres requis, incluant la linéarité, l'étude de la précision et de la justesse, les effets matrice, le recouvrement et l'efficacité globale de la méthode. Pour les quatre parabènes étudiés, l'ensemble de ces critères ont obtenus des résultats compris dans les critères d'acceptabilité demandés par les guides de validation analytique.

Les limites de quantification de la méthode de dosage développée dans notre étude font partie des plus basses retrouvées dans la littérature (Tableau 29). Seule la méthode développée par *Pycke et al.* présente des limites de quantifications inférieures aux nôtres [164]. Toutefois, dans cette étude, les LOQ étaient déterminées de façon instrumentale et non pas en étudiant les critères de validation de méthode au point bas de la gamme (justesse et précision). De plus, la gamme de calibration n'était pas précisée, ne permettant pas de conclure réellement sur les limites de cette méthode.

Tableau 29: Comparaison des limites de quantification des parabènes dans le plasma ou le sérum

| Etude                          | Population d'étude          | Type d'échantillons | Volume d'échantillon (µL) | LOQ (ng/mL) |          |          |          |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------------|-------------|----------|----------|----------|
|                                |                             |                     |                           | MePb        | EtPb     | PrPb     | BuPb     |
| <b>Notre étude</b>             | Nouveaux-nés                | Plasma              | 50                        | 0,025       | 0,025    | 0,025    | 0,025    |
| <b>Kolatorova et al [194]</b>  | Adultes sains               | Plasma              | 500                       | 0,171       | 0,148    | 0,171    | 0,133    |
| <b>Shekhar et al [195]</b>     | Femmes enceintes            | Sang total          | 1000                      | 2,77*       | 2,14*    | 1,58*    | 1,52*    |
| <b>Ye et al [196]</b>          | Adultes sains               | Sérum               | 100                       | 0,33*       | 0,33*    | 0,66*    | 0,66*    |
| <b>Pycke et al [164]</b>       | Nouveaux-nés                | Sang de cordon      | 100                       | 0,0009**    | 0,0008** | 0,0005** | 0,0010** |
| <b>Geer et al [197]</b>        |                             |                     |                           |             |          |          |          |
| <b>Mulla et al [162]</b>       | Nouveaux-nés                | DBS                 | 15                        | 20          | 20       | 20       | 20       |
| <b>Frederiksen et al [163]</b> | Adultes sains               | Sérum               | 500                       | 0,5         | 0,5      | 0,5      | 0,5      |
| <b>Shen et al [198]</b>        | Adultes avec cancer du sein | Plasma              | 500                       | 0,66*       | 0,99*    | 0,99*    | 1,32*    |
| <b>Yakkundi et al [189]</b>    | Nouveaux-nés                | DBS                 | 15                        | 20          | /        | 20       | /        |
| <b>Sandanger et al [199]</b>   | Adultes sains               | Plasma              | 500                       | 23,1*       | 9,9*     | 6,6*     | /        |
| <b>Vela-Soria et al [200]</b>  | Adultes sains               | Sérum               | 1000                      | 0,6         | 0,2      | 0,7      | 0,6      |
| <b>Hines et al [201]</b>       | Adultes sains               | Sérum               | 100                       | 0,33*       | 0,33*    | 0,66*    | 0,66*    |

\* : LOQ non précisées dans l'étude. LOQ déduite par le rapport de 3,3 fois la LOD. \*\* : LOQ instrumentale. DBS : Dried Blood Spot

Certaines de ces études ont recours à la limite de détection pour quantifier les parabènes dans leurs échantillons. Ainsi dans l'étude réalisée par *Mulla et al.* [162], les échantillons dont les concentrations en analytes sont comprises entre la LOQ et la LOD sont prises en compte dans le calcul de l'exposition. Toutefois, la LOD ne permet pas de quantifier efficacement un composé dans un échantillon mais uniquement d'attester de sa présence, car la précision et la justesse y sont moins bonnes. Notre méthode présente donc la capacité de pouvoir quantifier de façon fiable de très faibles quantités de parabènes dans le plasma.

De plus, notre méthode permet de travailler sur un volume d'échantillon faible (50  $\mu$ L), condition indispensable pour pouvoir étudier l'exposition des nouveau-nés prématurés chez qui les volumes de prélèvements doivent rester minimes. La plupart des méthodes analytiques de la littérature requièrent de travailler sur des volumes d'échantillons compris entre 0,1 et 1 mL. A titre d'exemple, la méthode développée par *Kolatorova et al.* [194] nécessite 500 $\mu$ L de sang pour atteindre une LOQ quasiment 7 fois supérieure à la nôtre. Deux études permettent de travailler avec des volumes inférieurs aux nôtres en utilisant la technique du Dried Blood Spot [162,189]. Néanmoins, dans les 2 cas, les limites de quantification étaient très importantes et un grand nombre d'échantillons ont été détectés mais non quantifiés.

Notre méthode apporte donc des éléments pertinents vis-à-vis de la littérature, en permettant de doser de façon fiable de faibles concentrations de parabènes dans de faibles volumes d'échantillons.

La mise au point de notre méthode s'est effectuée sur du plasma synthétique. En effet, durant le développement sur du plasma issu de donneurs sains, nous avons observés une contamination de la matrice par le méthylparabène. Cette contamination a déjà été rapportée dans la littérature pour des échantillons d'urines [186,187,202] mais n'avait pas été rapportée à présent pour les méthodes développées sur la matrice plasma. Cette contamination basale justifie notre choix de travailler sur une matrice synthétique pour limiter cette contamination. Le plasma synthétique utilisée a montré une faible contamination résiduelle par le méthylparabène, sa composition est connue et publiée [203,204]. De plus, l'étude des effets matrices a démontré qu'ils étaient limités et que l'utilisation d'une matrice synthétique était possible dans ces conditions.

Notre méthode a permis de déterminer des concentrations en méthyle et en propylparabène dans la plupart des échantillons. Les autres méthodes de la littérature n'auraient pas permis de quantifier de façon aussi précise ces concentrations plasmatiques en parabènes. Ainsi, si on compare nos résultats aux LOQ obtenus dans les études développées sur sang de nouveau-nés, seulement un échantillon aurait été quantifié en méthylparabène avec la méthode de *Mulla et al.* ou celle de *Yakkundi et al.*, aucun pour les 3 autres parabènes. Dans notre série de nouveau-nés, de fortes variations des concentrations plasmatiques ont été observées entre les différents échantillons pour le méthyle, l'éthyle et le propylparabène. Même si la quantification de ces échantillons n'avait pas pour objectif d'étudier l'exposition des nouveau-nés prématurés mais de tester l'applicabilité de la méthode, cela démontre que cette population n'est pas exposée de façon homogène. Pour autant, ces échantillons provenaient tous de nouveau-nés hospitalisés dans le même service ce qui permet donc de mettre en évidence des variations d'exposition au sein d'un même service de soins. Ces différences peuvent être

dues à des différences de prise en charge entre ces enfants, et donc une exposition plus ou moins importante à des parabènes, notamment par les médicaments.

Toutefois, d'autres facteurs peuvent être responsables de ces variations de concentrations plasmatiques, notamment le métabolisme. En effet, le métabolisme des parabènes reste mal connu à l'heure actuelle, d'autant plus chez le nouveau-né chez qui les fonctions métaboliques sont immatures. Après ingestion par voie orale, les parabènes sont quasi-complètement et rapidement absorbés au niveau du tractus digestif. Ils sont ensuite métabolisés au niveau hépatique par une voie oxydative qui aboutit à la formation d'acide para-hydroxybenzoïque (pHBA), ce dernier étant conjugué à la glycine pour former de l'acide para-hydroxyhippurique (pHHA). Il existe également deux autres voies minoritaires de sulfonation et de glucuronidation qui aboutissent à la formation de conjugués sulfate et glucuronide. L'ensemble de ces voies métaboliques a pour objectif de rendre les parabènes plus hydrosolubles afin de les éliminer plus facilement par le rein [120,127,128]. De plus, ce métabolisme peut être sujet à des variations interindividuelles [205].

## **5. CONCLUSION**

La méthode de dosage développée dans cette étude permet de doser de façon fiable et ultrasensible quatre parabènes dans le plasma de nouveau-nés. C'est la seule méthode développée à ce jour qui permet de travailler sur un faible volume d'échantillon et avec la LOQ la plus basse. Elle permettra d'étudier précisément l'exposition des nouveau-nés, et notamment les prématurés, aux parabènes.

## **CHAPITRE 3 : STRATEGIES D'EVICITION DES PARABENES DANS LES MEDICAMENTS, LE CAS DES PREPARATIONS**

Ce chapitre détaille la recherche de prises en charge alternatives permettant de diminuer l'exposition aux parabènes des nouveau-nés via l'administration des médicaments. Nous commencerons par détailler les stratégies, et les impasses, concernant les médicaments commercialisés par des laboratoires pharmaceutiques. Puis, nous présenterons des résultats concernant les préparations pharmaceutiques permettant de mettre au point des préparations adaptées à la pédiatrie et exemptes de parabènes.

### **IDENTIFICATION DES ALTERNATIVES AUX MEDICAMENTS CONTENANT DES PARABENES IDENTIFIES DANS L'ETUDE PROSPECTIVE MULTICENTRIQUE**

#### **1. INTRODUCTION**

Les deux études décrites dans ces travaux ont permis de mettre en évidence l'exposition des nouveau-nés aux parabènes via l'administration des médicaments. Nous y avons décrit cette exposition, en termes de fréquences et de quantité, et identifié l'ensemble des médicaments (spécialités industrielles et préparations pharmaceutiques) y concourant. Au final, 32 médicaments (spécialités et préparations) sont directement impliqués dans l'exposition de cette population aux parabènes.

Dans cette première partie, nous avons cherché à identifier des alternatives possibles aux médicaments commercialisés par des laboratoires pharmaceutiques. Pour chacun des médicaments identifiés, nous avons recherché l'existence d'autres formes galéniques utilisables, avec le même principe actif et sans parabènes.

Pour chacun des médicaments identifiés, nous avons adopté la démarche suivante :

- Recherche de formes galéniques utilisables chez les nouveau-nés, avec le même principe actif et sans parabènes ;
- Recherche d'autres principes actifs ayant des indications communes ;
- En cas d'identification d'une alternative, étude de sa prescription dans les autres centres utilisateurs.



## 2. IDENTIFICATION DES ALTERNATIVES

### 2.1. Cas du Ferrostrane®

Ce médicament est indiqué, selon le thésaurus de la SFN, dans la prise en charge des anémies par carence martiale (en préventif et en curatif) chez le nouveau-né de moins d'un an. Tous les centres, sauf un, ont utilisé ce médicament et la très grande majorité des prescriptions a été réalisée chez les nouveau-nés prématurés. En effet, les enfants prématurés sont à haut risque de carence en fer et nécessitent une supplémentation ferrique pour éviter une altération de leur développement cérébral [206]. Pour l'unique centre n'ayant pas utilisé le Ferrostrane®, la supplémentation en fer a été assurée par l'utilisation de gélules de fer AP-HP à 2,5 mg, après ouverture de la gélule et dilution dans de l'eau avant administration. Ce médicament possède les mêmes indications que le Ferrostrane® et pourrait donc constituer une alternative envisageable pour limiter l'exposition aux parabènes.

### 2.2. Cas du paracétamol

L'utilisation du paracétamol rend dans le cadre de la prise en charge de la douleur. L'absence de prise en charge de la douleur peut avoir des retentissements neurodéveloppementaux à court et moyen terme [207]. Plusieurs formes galéniques de paracétamol ont été prescrites chez les nouveau-nés inclus dans l'étude : injectable, suppositoire, suppositoire et solution buvable. C'est cette dernière forme, et plus particulièrement le Doliprane® 2,4%, qui a exposé les nouveau-nés à 3 parabènes (méthyle, éthyle et propylparabène).

Certains centres ont utilisé une solution buvable de paracétamol dépourvue de parabènes, le Paracétamol 3% (EfferalganMed® 30 mg/mL) mais cette utilisation est restée fortement minoritaire vis-à-vis de la forme avec parabènes alors qu'elle pourrait constituer une alternative envisageable. Également, l'utilisation des autres formes galéniques sans parabènes pourraient réduire l'exposition aux parabènes même si certaines limitations restent présentes (limitation de la voie injectable, forme suppositoire pas toujours adaptée.).

Trois autres médicaments indiqués dans la prise en charge de la douleur ont été prescrits durant l'étude : kétamine, morphine et sufentanil. Néanmoins, elles présentent des effets analgésiques bien plus puissants et ne peuvent remplacer le paracétamol, antalgique de palier I, utilisés pour des douleurs faibles à modérées.

### **2.3. Cas de la gentamicine**

La gentamicine, un antibiotique de la classe des aminosides a été utilisé pour l'ensemble des centres d'inclusion. D'après le thésaurus de la SFN, il est indiqué dans la prise en charge des suspicions d'infections bactériennes néonatales, d'infection néonatales bactériennes précoces ou encore d'infections à germes sensibles. Dans notre étude, ce médicament a été prescrit dans tous les groupes de nouveau-nés de façon équivalente, cette proportion est également retrouvée dans la littérature [208], il fait également partie des antibiotiques les plus prescrits dans cette population [209]. A l'heure actuelle, il n'existe pas de forme galénique de gentamicine dépourvue de parabènes et son unique alternative dans cette classe, l'amikacine, présente des indications différentes. La tobramycine, autre aminoside, ne possède pas d'indications en pédiatrie mais il serait intéressant d'évaluer son usage chez les nouveau-nés pour envisager de l'utiliser en alternative à la gentamicine.

### **2.4. Cas du Gaviscon®**

Concernant le Gaviscon®, il est indiqué dans la prise en charge du reflux gastro-œsophagien chez le nouveau-né. Comme pour la gentamicine, l'ensemble de ces présentations contiennent des parabènes, exceptée la forme comprimé non utilisable chez l'enfant. Cela limite de fait la possibilité de substituer ce médicament avec une autre formulation galénique. Néanmoins, ce médicament n'a été utilisé que dans 21 centres, suggérant la possibilité d'utiliser d'autres prises en charge. En effet, la prise en charge du RGO chez le nouveau-né peut faire appel à d'autres molécules telles que l'ésooméprazole pour laquelle une formulation spécialement dédiée à l'enfant et exempte de parabènes existe. Ce médicament a d'ailleurs été utilisé dans sept centres de notre étude. Une préparation présente au Formulaire national, le Julep gommeux, pourrait également constituer une alternative raisonnable [210].

### **2.5. Cas de la Mycostatine® et de la Fungizone®**

La Mycostatine® en suspension buvable est indiquée dans la prévention des candidoses chez les sujets à risque (dont les prématurés), les candidoses digestives et les candidoses cutanéomuqueuses. Près de 30% des centres ont utilisés ce médicament tandis que les autres centres ont utilisé la Fungizone® en suspension buvable qui possède les mêmes indications mais qui possède également des parabènes, ainsi que de l'éthanol et du benzoate de sodium, ou encore du fluconazole en suspension buvable dépourvue de parabènes mais contenant également du benzoate de sodium. Ce dernier excipient

contre-indique l'utilisation des médicaments chez le nouveau-né de moins de 8 semaines en raison du risque d'ictère nucléaire dû au déplacement de la bilirubine de l'albumine par l'acide benzoïque. L'analyse des prescriptions de Mycostatine® montre que 87% des nouveau-nés ayant reçus ce médicament avaient moins de 8 semaines à la prescription, contre-indiquant de fait l'utilisation du fluconazole en suspension buvable. Pour la Fungizone®, ce pourcentage était de 94%. Dans les 2 cas, il n'existe donc pas d'alternative sans parabènes utilisable dans ces indications chez le nouveau-né.

## **2.6. Cas de la Josacine®**

Pour la Josacine®, 30% des centres ont utilisé ce médicament pour le dosage à 125 mg et 11% pour le dosage à 250 mg. Les deux dosages ont été majoritairement prescrits chez les nouveau-nés prématurés de moins de 28 SA et dans une moindre mesure dans les autres groupes d'âge gestationnel. D'après le thésaurus de la SFN, ce médicament est indiqué dans la prise en charge d'infections à germes sensibles. Cette indication seule ne permet pas d'évaluer les stratégies de prise en charge associées à ce médicament et donc de proposer une alternative dans le cadre de cette étude. Néanmoins, l'absence d'utilisation de ces médicaments par l'ensemble des centres suggère qu'il existe une alternative potentielle. Un seul autre macrolide a été prescrit durant l'étude, l'azithromycine, et pourrait constituer une alternative. Seule l'étude des indications de prescriptions permettra de répondre à cette hypothèse.

## **2.7. Cas du Lasilix®**

Concernant le Lasilix®, il est utilisé par 70% des centres et les indications du thésaurus SFN sont : rétention hydrique, œdème pulmonaire, insuffisance cardiaque congestive, hypertension artérielle, insuffisance rénale aiguë et sécrétion inappropriée d'hormone anti-diurétique. Il est utilisé dans toutes les catégories d'âge gestationnel, avec une prédominance chez les nouveau-nés à terme et les nouveau-nés prématurés de 32-36 SA. Ces indications multiples ne permettent pas de définir les stratégies d'utilisation de ce médicament. Toutefois, il existe d'autres molécules de la famille des diurétiques qui possèdent des indications communes et dépourvues de parabènes. C'est le cas de la spironolactone pour la rétention hydrique mais qui n'existe que sous forme de préparations magistrales et hospitalières de façon adaptée aux enfants. Plusieurs centres ont utilisé la spironolactone sous cette forme mais avec une formulation contenant des parabènes. Dans partie suivante de ce chapitre, nous détaillons une stratégie d'éviction des parabènes dans les préparations.

## **2.8. Cas du Levocarnil®**

Le Levocarnil® (L-carnithine) en solution buvable est indiqué dans la prise en charge des déficits en carnitine secondaire aux aciduries organiques, des déficits de la beta-oxydation des acides gras et des déficits primaires en carnitine. Ce médicament a été prescrit dans 5 centres, dont un particulièrement puisque 22% des nouveau-nés inclus y ont été exposés.

Il existe une forme galénique injectable de L-carnithine, sans parabènes. C'est donc une alternative à envisager pour la prise en charge des nouveau-nés.

## **2.9. Cas de l'Un-Alfa®**

L'Un-Alfa® (alfacalcidol) en solution buvable est indiqué pour la prise en charge des hypocalcémies néonatales tardives, des hypoparathyroïdismes, des pseudo-hypoparathyroïdismes et des ostéodystrophies rénales. Ce médicament a été utilisé dans 25 des centres d'inclusion et deux groupes d'âge gestationnel ont été principalement exposés : les nouveau-nés prématurés de moins de 28 SA et ceux de 32-36 SA.

Concernant cette molécule, deux alternatives galéniques sans parabènes sont commercialisées : une forme en capsule et une forme injectable. Ces deux spécialités pourraient donc représenter des alternatives envisageables pour limiter l'exposition des nouveau-nés aux parabènes. Néanmoins, ces spécialités n'ont pas été prescrites dans cette étude, limitant la possibilité d'envisager pleinement ces alternatives.

## **2.10. Cas du Vedrop®**

Le Vedrop® (tocofersolan) est indiqué dans la prise en charge des carences en vitamine E en cas de malabsorption digestive, notamment en cas de cholestase hépatique. Ce médicament a été prescrit dans 7 centres, majoritairement à des nouveau-nés prématurés de moins de 28 SA.

D'autres médicaments contenant de la vitamine E sont disponibles sur le marché français et utilisables chez le nouveau-né : la vitamine E injectable, une ATU nominative en suspension buvable, des mélanges polyvitaminés et l'Uvesterol ADEC. Néanmoins, la posologie nécessaire dans les cas de malabsorption associée à une cholestase hépatique est de 17 mg/kg/j ce qui exclut l'utilisation de ces

deux derniers médicaments. L'ATU nominative de vitamine E (dosée à 100 mg/mL) pourrait constituer une alternative et, d'après l'ANSM, elle peut être utilisée dans le cas de malabsorption dues à des cholestases.

### **2.11. Cas de l'Epivir® et du Viramune®**

Chez l'enfant de moins d'un mois, l'Epivir® (Lamivudine) est indiqué pour la prévention de la transmission materno-fœtale du VIH. Pour les enfants de plus d'un mois, il est indiqué dans le traitement du VIH. Ce médicament a été utilisé dans 23% des centres, en majorité à des nouveau-nés à terme. Le Viramune® (Névirapine) possède les mêmes indications et a également une spécificité d'emploi pour les enfants chez qui le risque d'entérocolite nécrosante est élevé. Il a également été utilisé dans 23% des centres, la plupart du temps chez des nouveau-nés à terme. Ces deux médicaments ont essentiellement été prescrits dans les mêmes centres.

Selon le rapport du groupe d'experts sur le VIH [211], la zidovudine est le traitement de référence pour la prévention de la transmission materno-fœtale du VIH chez le nouveau-né à terme avec un faible risque d'infection. Ce même groupe place néanmoins la névirapine au même niveau pour la recommandation de prise en charge, voire même en première ligne en raison de sa facilité d'administration (prise unique journalière). Dans cette situation, la zidovudine pourrait donc être une alternative envisageable mais la présence d'acide benzoïque dans sa composition contre-indique son utilisation chez les nouveau-nés de moins de 8 semaines qui constituent la population cible de cette indication.

Pour le nouveau-né à terme avec un risque élevé d'infection, le groupe d'experts recommande l'instauration immédiate à la naissance d'une trithérapie zidovudine/lamivudine/névirapine. Cette situation ne permet donc pas d'envisager d'alternatives sans parabènes.

Chez le nouveau-né prématuré, l'utilisation de la zidovudine est le schéma de référence. L'utilisation de la lamivudine et de la névirapine n'est recommandée qu'en cas de risque élevée d'infection. Ces schémas de prescription sont cohérents avec les fréquences de prescriptions, en fonction de l'âge gestationnel, relevées dans notre étude. De plus, lamivudine et névirapine ont été prescrits dans les mêmes centres.

## **2.12. Cas du Keppra® et de la Depakine®**

Le Keppra® (Levetiracetam) a été prescrit dans dix centres, essentiellement à des nouveau-nés à terme. Ce médicament est indiqué dans la prise en charge de l'épilepsie partielle.

La Dépakine® (Valproate de sodium) est indiqué dans la prise en charge des épilepsies partielles, des épilepsies généralisées et la prévention de la récurrence des convulsions fébriles. Un seul centre a utilisé ce médicament, uniquement chez les nouveau-nés à terme.

D'autres molécules aux propriétés antiépileptiques ont été prescrites chez les nouveau-nés de cette étude : phénytoïne et fosphénytoïne (traitement de mal épileptique), phenobarbital (traitement d'entretien des épilepsies partielles ou généralisées), clonazepam (traitement de l'état de mal convulsif) et diazepam (prévention de la récurrence des convulsions fébriles). Tous ces médicaments existent sous forme buvable sauf la fosphénytoïne. Pour la phénytoïne, il existe une ATU en solution buvable mais sa composition comporte du benzoate de sodium contre-indiquant son utilisation chez l'enfant de moins de 8 semaines. Pour palier cela, nous proposons dans la partie suivante une préparation pharmaceutique de phénytoïne sans parabènes.

## **2.13. Cas du Flagyl®**

Selon le thésaurus de la SFN, le Flagyl® (métronidazole) est indiqué chez le nouveau-né pour la prise en charge des infections à germes anaérobies (sepsis, entérocolite, méningite). Ving-huit pour cent des centres d'inclusion ont utilisé ce médicament. Dans la majorité des cas, cette spécialité a été prescrite chez les nouveau-nés prématurés de 32-36 SA, et dans une moindre mesure dans les autres groupes d'âge gestationnel. Certaines des indications possibles de cet antibiotique chez les nouveau-nés prématurés sont les infections nosocomiales à germes anaérobies ou des infections digestives, notamment les entérocolites nécrosantes [212,213].

Le métronidazole est également commercialisé sous une forme injectable dépourvue de parabènes. Cette formulation pourrait donc représenter une alternative envisageable à l'utilisation de la voie orale. Par ailleurs, cette forme injectable a été utilisée plus fréquemment et dans plus de centres que la suspension buvable. Il existe également une possibilité de réaliser une préparation hospitalière de métronidazole, sous forme de suspension buvable, avec un agent de suspension exempts de parabènes [214].

## **2.14. Cas de la digoxine**

La digoxine est indiquée dans la prise en charge des insuffisances cardiaques congestives et des troubles du rythme supraventriculaires. Dans notre étude, cette molécule a été prescrite essentiellement aux nouveau-nés prématurés de 32-36 SA et dans une moindre mesure au nouveau-nés prématurés de 28-31 SA, et son utilisation est restée marginale avec uniquement 6 centres utilisateurs. Concernant les troubles du rythme supraventriculaires, deux autres molécules peuvent être employées dans cette indication, telles que le propranolol ou l'amiodarone [215].

Néanmoins, en l'absence d'indications associés aux prescriptions de cette molécule, il n'est pas possible de conclure efficacement sur les alternatives envisageables.

## **2.15. Cas de la Rifadine®**

La Rifadine® (rifampicine) est, selon le thésaurus de la SFN, utilisée pour la prophylaxie des méningites à méningocoque et la prise en charge des infections graves à germes Gram+. Cette molécule n'est pas utilisée en monothérapie et est notamment retrouvée en cas de d'infections à des germes résistants à la méticilline [216]. Dans certains cas, elle peut également être utilisée pour la prise en charge des tuberculoses congénitales [217]. Seulement 3 centres ont utilisé ce médicament avec une répartition homogène entre les nouveau-nés prématurés de moins de 28 SA et ceux de 28-31 SA.

Il existe une forme galénique injectable de cette molécule, dépourvue de parabènes. Cette alternative est donc à envisager pour limiter l'exposition des nouveau-nés aux parabènes mais le faible nombre de prescriptions et surtout l'absence des indications de prescriptions ne permettent pas de conclure efficacement à la possibilité de cette alternative, notamment pour la prise en charge de la tuberculose qui nécessite un traitement long limitant de fait l'utilisation de la voie injectable.

## **2.16. Cas du Bactrim®**

Comme pour la Rifadine®, le Bactrim® n'a été utilisé que par 3 centres d'inclusion. Ce médicament a été prescrit chez les nouveau-nés prématurés 28-31 et 32-36 SA, dans une moindre mesure chez les nouveau-nés à terme et jamais chez les nouveau-nés de moins de 28 SA. D'après le thésaurus de la SFN, ce médicament est indiqué dans la prise en charge des infections à germes sensibles. Ici aussi, cette molécule existe sous une forme galénique injectable dépourvue de parabènes. Son utilisation doit donc être considérée afin de limiter cette exposition des nouveau-nés. Toutefois, étant donné le faible

nombre de prescriptions et l'absence d'indications, il est à nouveau impossible de conclure sur la possibilité de cette alternative. De plus, l'usage même de cette molécule pourrait être à évaluer, étant donné les soupçons d'association entre ictère nucléaire et ce médicament [218].

### **2.17. Cas de l'Oraciline®**

Selon le thésaurus de la SFN, l'Oraciline® (phenoxyéthylpénicilline) est indiqué dans la prophylaxie des cas contact de scarlatine, la prophylaxie des infections pneumocoque, la prophylaxie de la rechute du rhumatisme articulaire aigu et la prise en charge des angines documentées à Streptocoque A. Ce médicament n'a été prescrit que dans un seul centre, uniquement à un nouveau-né à terme.

Etant donné l'utilisation très restreinte de ce médicament, il convient de s'interroger sur sa place chez les nouveau-nés. Néanmoins, en l'absence des indications de prescriptions, il est impossible de répondre à cette question ou de proposer une alternative sans parabènes.

### **2.18. Cas du Théralène®**

Ce médicament (alimémazine) n'a été prescrit que dans un seul centre, quasiment uniquement chez les nouveau-nés prématurés de moins de 28 SA. Aucune indication n'est référencée dans le thésaurus de la SFN chez les nouveau-nés, qu'ils soient à terme ou prématurés. Chez l'enfant de plus d'un an, il peut être utilisé pour traiter les insomnies d'endormissement ou pour de la sédation avant examen.

Etant donné l'absence d'indications dans la population d'étude et le faible nombre de prescriptions, il convient de s'interroger sur la place de ce médicament contenant des parabènes chez les nouveau-nés. Toutefois, sans les indications de prescription, il est impossible de répondre à cette question ou de proposer une alternative sans parabènes.

### **2.19. Cas de la Dépakine®**

La Dépakine® (Valproate de sodium) est indiqué dans la prise en charge des épilepsies partielles, des épilepsies généralisées et la prévention de la récurrence des convulsions fébriles. Un seul centre a utilisé ce médicament, uniquement chez les nouveau-nés à terme. D'autres molécules aux propriétés antiépileptiques ont été prescrites chez les nouveau-nés de cette étude : phénytoïne, fosphénytoïne, phenobarbital, clonazepam, diazepam. Ces prescriptions laissent supposer que des alternatives à



l'utilisation de la Depakine® sont possibles mais cela ne pourra être confirmé que par l'étude des indications.

### **2.20. Cas du Propranolol Rosemont**

Ce médicament a été prescrit dans un seul centre, uniquement à des nouveau-nés à terme. Cette spécialité est sous statut d'ATU (Autorisation Temporaire d'Utilisation) et est indiqué dans la prise en charge des troubles du rythme.

Il existe d'autres spécialités de propranolol ayant la même forme galénique, notamment l'Hemangiol®. Ce dernier a été initialement développé pour la prise en charge des hémangiomes mais il existe une RTU (Recommandation Temporaire d'Utilisation) avec les mêmes indications que le Propranolol Rosemont. Il constitue donc une alternative sans parabènes utilisable. Par ailleurs, l'Hemangiol® a également été prescrit aux nouveau-nés inclus dans l'étude.

### **2.21. Cas de la Dompéridone**

La dompéridone en solution buvable (Motilium®) a été prescrite dans un centre, uniquement à un nouveau-né prématuré de 32-36 SA. Ce médicament est indiqué dans la prise en charge des vomissements ainsi que du RGO.

Parmi les autres molécules antiémétiques, seul le métoclopramide est formulé sous une forme buvable adaptée l'enfant. Néanmoins, cette dernière contient également des parabènes comme excipient.

### **2.22. Cas du Locapred®**

Ce médicament (désônide) a été prescrit dans un seul centre chez un nouveau-né prématuré de moins de 28 SA. Il est indiqué pour la prise en charge des dermatites atopiques, de l'eczéma et du psoriasis.

Il existe une autre spécialité (Locatop® 0,1%), avec la même molécule, la même forme galénique et la même teneur, sans parabènes. Cette dernière pourrait constituer une alternative envisageable à l'utilisation du Locapred®.

## 2.23. Cas du potassium

Le potassium en solution buvable est le médicament contenant des parabènes le moins prescrit de cette étude avec uniquement 4 lignes de prescription chez un nouveau-né prématurés de moins de 28 SA. Une alternative à ce médicament, avec la même formulation galénique et sans parabènes, existe et pourrait ainsi être utilisée.

## 3. DISCUSSION

Parmi les médicaments contenant des parabènes et prescrits dans notre étude, nous avons pu proposer des prises en charge alternatives sans parabènes permettant de limiter l'exposition des nouveau-nés. C'est notamment le cas pour le Ferrostrane<sup>®</sup>, le Doliprane<sup>®</sup>, le Gaviscon<sup>®</sup>, le Levocarnil<sup>®</sup>, l'Un-Alfa<sup>®</sup>, le Vedrop<sup>®</sup>, le Flagyl<sup>®</sup>, le Propranolol Rosemont, le Locapred<sup>®</sup> et le Potassium Richard. Ces alternatives ont été proposées de différentes façons :

- Même principe actif et même forme galénique (Doliprane<sup>®</sup>) ;
- Même principe actif et forme galénique différente (Levocarnil<sup>®</sup>) ;
- Principe actif différent mais indication commune (Gaviscon<sup>®</sup>) ;
- Mise au point de préparations pharmaceutiques avec des principes actifs différents mais des indications communes (Lasilix<sup>®</sup>).

Ainsi, parmi les 32 médicaments concernés, 10 ont pu faire l'objet d'une proposition d'alternative sans parabènes.

Pour les autres médicaments, l'absence des indications associées aux prescriptions n'a pas permis de formuler d'alternatives envisageables. Certaines spécialités peuvent être prescrites pour des indications différentes et les possibilités de substitution peuvent donc varier selon les situations. Cela limite de fait la possibilité de proposer des stratégies de prise en charge moins exposantes en parabènes.

Enfin, dans 5 situations (Mycostatine<sup>®</sup>, Fungizone<sup>®</sup>, Epivir<sup>®</sup>, Viramune<sup>®</sup>, dompéridone), les alternatives envisagées ne sont pas utilisables, soit car elles contiennent également des parabènes, soit car les recommandations de prise en charge ne permettent pas de se passer des médicaments contenant des parabènes. Dans ce cas, seuls les laboratoires pharmaceutiques commercialisant ces médicaments peuvent faire évoluer leurs formulations galéniques afin de limiter l'exposition des nouveau-nés.

Concernant les préparations, cet aspect est évoqué dans la prochaine partie.

## **PREPARATION AND PHYSICOCHEMICAL STABILITY OF LIQUID ORAL DOSAGE FORMS FREE OF POTENTIALLY HARMFUL EXCIPIENT DESIGNED FOR PEDIATRIC PATIENTS**

### **1. INTRODUCTION**

L'administration des médicaments par voie orale à la population pédiatrique reste un enjeu important, notamment en raison du manque de formulations appropriées, provoquant des interrogations sur la précision de la dose administrée [219]. De plus, des facteurs spécifiques de cette population, comme la capacité à avaler, les problématiques de palatabilité, etc. peuvent altérer l'administration des formes galéniques orales [220]. En effet, la plupart des médicaments commercialisés sont conçus pour les adultes et ne permettent pas une facilité d'utilisation chez l'enfant [221]. Malgré les efforts des autorités de santé pour promouvoir le développement de médicaments pédiatriques, beaucoup de spécialités pharmaceutiques ne sont autorisées que pour la population adulte et ne sont pas disponibles avec une formulation adaptée à l'administration pédiatrique [222]. En conséquence, soignants et parents doivent fréquemment modifier des médicaments, utilisés de façon hors-AMM, pour permettre l'administration, provoquant un risque d'erreur de dose et d'altération de la stabilité et de la biodisponibilité des molécules [223]. Pour éviter les manipulations de formes galéniques, les préparations pharmaceutiques peuvent être proposées en remplacement. Parmi les différentes possibilités de préparations, les formes orales liquides représentent une alternative intéressante chez l'enfant, permettant une meilleure flexibilité des doses ainsi qu'une facilité pour avaler, comparé aux formes orales solides [222]. Néanmoins, ces formes liquides peuvent nécessiter l'emploi d'excipients inadaptés chez l'enfant (véhicules de suspension, conservateurs...).

La dexaméthasone, l'hydrochlorothiazide, la phénytoïne et la spironolactone sont 4 principes actifs (PA) couramment utilisés en néonatalogie [224–226]. Néanmoins, dans de nombreux pays, il n'existe pas de formulations galéniques compatibles avec une administration orale de ces principes actifs chez l'enfant. Selon la littérature, plusieurs méthodes permettant de réaliser des préparations orales liquides contenant ces PA ont été décrites [227–233]. Ces méthodes utilisent des véhicules de suspensions dont la composition fait intervenir des agents de suspensions (carboxyméthylcellulose sodium, gomme xanthane), des agents de dispersion (propylène glycol, diméthicone), des agents édulcorants (saccharine, sucralose), des conservateurs (méthylparabène, propylparabène, acide

benzoïque) et de l'eau comme solvant. Un problème de ces formulations est qu'elles contiennent potentiellement des excipients à effets notoires (EEN), tels que les parabènes ou le benzoate de sodium). L'exposition des nouveau-nés aux EEN pose un problème de santé étant donné leur association avec des problèmes de toxicité, de réactions allergiques ou encore d'intolérance [234,235]. En effet, le benzoate de sodium peut induire des hyperbilirubinémies sévères en raison de sa capacité à déplacer la bilirubine de l'albumine [236]. En conséquence, le benzoate de sodium est contre-indiqué chez les nouveau-nés de moins de 8 semaines. D'autre part, les parabènes sont considérés comme des perturbateurs endocriniens [138]. L'exposition durant la période développementale aux PE, *in utero* et durant les premiers jours de vie, est associée à de nombreux effets et pourrait augmenter le risque de développer des pathologies à l'âge adulte [11,69]. C'est dans ce contexte que l'Agence Européenne du Médicament a recommandé d'éviter leur usage dès que possible, notamment dans les formulations pédiatriques [154]. La mise au point de formes galéniques sans PE, et sans parabènes, nécessite, comme pour tout médicament, des études de stabilité physicochimiques, notamment car certains EEN peuvent avoir des propriétés antioxydantes, comme les parabènes ou l'acide benzoïque [237].

Au vu de ces éléments, l'objectif de notre étude était d'évaluer la faisabilité de la préparation de formes orales liquides sans excipients à effet notoire, incluant de la dexaméthasone, de l'hydrochlorothiazide, de la phénytoïne ou de la spironolactone comme principes actifs, et d'évaluer leur stabilité physicochimique.

## **2. MATERIEL ET METHODE**

### **2.1. Réactifs**

Le Syrspond® SF PH4 Dry (numéro de lot : 15H13-B03-312986) et la spironolactone (numéro de lot : 7E22-B11-335448) ont été achetés chez Fagron (Thiais, France). L'hydrochlorothiazide (numéro de lot : 005851) et la phénytoïne ont été achetés chez Inresa (Bartenheim, France). La dexaméthasone acétate (numéro de lot : 15090168/A) a été achetée chez Cooper (France). L'eau stérile a été achetée chez Fresenius (Versylène®, Sèvres, France).

Méthanol et acétonitrile de qualité HPLC ont été achetés chez Carlo-Erba (Val-de-Reuil, France), tandis que l'eau ultrapure a été obtenue à partir d'un système de purification de l'eau Direct-Q UV3 (Millipore®, Guyancourt, France).

## 2.2. Etude de faisabilité

Les formes galéniques orales liquides ont été préparées à une concentration cible de 5 mg/mL pour la spironolactone, la dexaméthasone et la phénytoïne, et de 2 mg/mL pour l'hydrochlorothiazide. Etant donné que ces principes actifs sont peu à très peu solubles dans l'eau (0,089, 0,722, 0,032, et 0,022 mg/mL, pour la dexaméthasone, l'hydrochlorothiazide, la phénytoïne, and spironolactone, respectivement [238]), l'utilisation d'un véhicule de suspension est obligatoire pour pouvoir préparer une forme orale liquide. Le Syrspend® SF PH4 Dry, une poudre conçue pour assurer une mise en suspension correcte et préparer des formes orales liquides, a été choisi car il est formulé quasiment uniquement avec de l'amidon, un excipient considéré comme inerte, et ne contient pas d'EEN.

Les suspensions orales furent préparées en accord avec les Bonnes Pratiques de Préparations [239] en respectant la procédure suivante :

- Premièrement, la quantité exacte de principe actif a été pesée pour pouvoir obtenir la concentration cible ;
- La poudre de principe actif a été mélangée à 13 g de Syrspend® SF PH4 Dry et triturée dans un mortier pour homogénéisation ;
- Ensuite, de l'eau stérile a été ajoutée, sous agitation continue, pour atteindre un volume final de 200 mL ;
- Après agitation et homogénéisation, la suspension a été répartie des flacons en verre (type 1) ambré de 20 mL.

La procédure a été entièrement réalisée en zone propre, afin de limiter les contaminations microbiologiques.

Afin de vérifier que les formulations permettaient une dispersion adéquate des principes actifs dans le véhicule de suspension, les teneurs en principes actifs ont été testées dans les préparations terminées. Pour cela, les concentrations (n = 6) de 3 lots différents ont été déterminées pour chaque forme galénique liquide, selon une méthode HPLC-UV décrite ci-dessous. Un échantillon d'un millilitre (n = 3) a été collecté après agitation pour obtenir une bonne dispersion du principe actif, puis dilué avec du méthanol (1/10, v/v) et centrifugé à 3500 g pendant 10 minutes. Le surnageant a ensuite été dilué avec du méthanol (1/10, v/v) avant injection dans le système HPLC. Selon la Pharmacopée US, l'uniformité de teneur est vérifiée si chaque préparation contient 90 à 110% de la concentration théorique [240].

### **2.3. Etude de stabilité**

Afin de pouvoir explorer l'influence de la température sur la stabilité physicochimique des suspensions, trois flacons des différents lots de chaque PA ont été stockés durant la durée de l'étude soit à température ambiante ( $22 \pm 4$  °C), soit de façon réfrigérée ( $5 \pm 3$  °C). Dans les deux cas, les températures ont été contrôlées de façon quotidienne.

Les concentrations en principe actif ont été contrôlés à J0, J7, J14, J30, J42 et J60, en utilisant les méthodes HPLC-UV décrites ci-dessous. Les échantillons de suspensions orales, prélevés après agitation pour assurer la dispersion uniforme en principe actif, ont été dilués dans du méthanol (1/10, v/v), puis centrifugés à 3500 g pendant 10 minutes. Le surnageant a ensuite été dilués dans du méthanol (1/10, v/v) avant injection dans le système HPLC.

Selon la Pharmacopée US, une préparation est considérée comme stable si la concentration en principe actif se maintient dans un intervalle compris entre 90 et 110% de la valeur initiale [241].

Osmolalité et pH ont également été déterminés durant l'étude de stabilité, en utilisant un osmomètre à pression de vapeur (VAPRO®, Wescor, Fontenay, France) et un pH-mètre (EcoScan®, Eutech Instrument, Fontenay, France), respectivement. De plus, l'apparence physique des suspensions a été évaluée par une inspection visuelle réalisée dans un flacon en verre transparent, afin de vérifier la couleur initiale et l'aspect opalescent des suspensions.

### **2.4. Développement des méthodes analytiques et validation**

L'analyse par HPLC-UV a été réalisée en utilisant un système chromatographique composé d'une pompe binaire à gradient (Hitachi L-2130®, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) et d'un échantillonneur (Hitachi L-2200®, VWR, Fontenay-sous-Bois, France), connecté à un détecteur UV-visible SPD-6A®, Shimadzu, Marne-la-Vallée, France). L'acquisition et le traitement des données chromatographiques a été effectué à l'aide du logiciel EasyChrom® (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Le système HPLC était opéré à température ambiante. Le volume d'injection était de 25 µL. Pour chaque principe actif, une méthode HPLC-UV indicatrice de stabilité a été développée et entièrement validée pour pouvoir déterminer de façon fiable les concentrations en principe actif. Les conditions chromatographiques utilisées pour chaque principe actif sont décrites dans le Tableau 30. La validation de chacune des méthodes a été réalisée en accord avec les recommandations du guide ICH Q2(R1) en évaluant les critères suivants : linéarité, exactitude (précision et justesse) et spécificité [242].

Tableau 30 : Caractéristiques des différentes méthodes analytiques développées pour déterminer les concentrations en dexaméthasone, hydrochlorothiazide, phénytoïne et spironolactone

|                      | Dexaméthasone                                       | Hydrochlorothiazide | Phénytoïne | Spironolactone |
|----------------------|---|---------------------|------------|----------------|
| Débit (mL/min)       | 1.0   | 1.5                 | 1.0        | 1.0            |
| Colonne              | Purospher® STAR RP-18 endcapped (5 µm) 150 x 4.6 mm |                     |            |                |
| Longueur d'onde (nm) | 238   | 224                 | 238        | 238            |

#### 2.4.1. Courbes de calibration

Afin de déterminer les concentrations en principes actifs dans les préparations, une méthode de calibration a été réalisée pour chaque principe actif. La gamme de calibration a été déterminée en fonction des concentrations cibles. Pour la dexaméthasone, la phénytoïne et la spironolactone, une solution initiale à 100 µg/mL a été préparée pour chaque molécule, puis diluée dans du méthanol afin d'obtenir 5 points de calibration (0, 12.5, 25, 50, et 100 µg/mL). Pour l'hydrochlorothiazide, une solution initiale à 100 µg/mL a été préparée, puis diluée dans du méthanol afin d'obtenir 6 points de calibration (0, 12, 14, 20, 24, et 28 µg/mL). Les courbes de calibrations ont été déterminées par une régression linéaire des moindres-carrés des aires du pic versus les concentrations en principes actifs.

#### 2.4.2. Linéarité et effets matrices

Cinq courbes de calibration ont été réalisées sur cinq jours différents. La linéarité a été déterminée par l'analyse des coefficients de corrélation ( $r^2$ ), des pentes et des ordonnées à l'origine des courbes de régression linéaire, ainsi qu'avec la détermination des résidus (exprimés en pourcentage de la valeur théorique).

Les effets matrices ont été évalués en comparant des courbes de calibration faites dans du méthanol versus des courbes obtenues en utilisant du Syrspend® SF PH4 Dry. Dans ce dernier cas, la dilution a été effectuée en utilisant du méthanol avec 10% du véhicule de suspension pour mimer la composition exacte des échantillons obtenus avec dilutions des suspensions buvables. Les ordonnées à l'origine et les pentes des courbes de régression ont été comparés à l'aide d'un test de Student ( $\alpha = 0,05$ ) pour évaluer la présence d'un effet matrice.

#### **2.4.3. Exactitude et limite de quantification**

L'exactitude des différentes méthodes a été déterminée par l'intermédiaire de la précision et de la justesse. Pour chaque principe actif, des contrôles qualités (CQ) furent préparés à 50 µg/mL pour la dexaméthasone, la phénytoïne et la spironolactone, à 20 µg/mL pour l'hydrochlorothiazide, en relation avec les concentrations des suspensions buvables diluées. La précision a été évaluée par l'intermédiaire des coefficients de variation des concentrations moyennes déterminées pour chaque CQ, sur le même jour pour la répétabilité (n = 6) et sur 3 jours pour la précision intermédiaire (n = 18). La justesse a été évaluée par la détermination du taux de recouvrement des CQ utilisés pour l'étude de la précision. Les limites de quantification (LOQ) ont été fixées au point le plus des gammes de calibrations correspondantes.

#### **2.4.4. Spécificité et capacité indicatrice de stabilité**

La capacité indicatrice de stabilité des différentes méthodes a été évaluée en vérifiant que les éventuels produits de dégradation ne co-éluent pas avec le pic du principe actif. Pour cela, un détecteur UV à barrettes de diodes (Waters 2996®, Guyancourt, France) a été utilisé pour obtenir des chromatogrammes en 3 dimensions. Chaque type de suspension orale a été soumise à différents stress (chaleur, conditions acides et basiques, oxydation) en accord avec les recommandations du guide ICH Q1. Les échantillons obtenus ont ensuite été injectés dans le système HPLC pour pouvoir comparer chromatogrammes d'échantillons dégradés et chromatogrammes non dégradés. Un test de pureté a également été effectué.

### **3. RESULTATS**

#### **3.1. Validation des méthodes analytiques**

Pour chaque principe actif, une méthode HPLC-UV a été développée et validée. Les courbes de calibration ont montré que la linéarité était satisfaisante sur l'ensemble des gammes de calibration avec des coefficients de corrélation supérieurs ou égaux à 0,9992 et des résidus inférieurs ou égaux à 5% (Tableau 31). De plus, les pentes moyennes et les ordonnées à l'origine obtenues avec le Syrspond® SF PH4 Dry ne présentaient pas de différences significatives avec celles obtenues dans le méthanol ( $p \geq 0,17$ ), démontrant ainsi l'absence d'effets matrices du véhicule du suspension. Dans ce cas, les courbes de calibration pourront être réalisées en diluant les principes actifs directement dans le méthanol, rendant l'analyse HPLC-UV plus simple et rapide.



Tableau 31: Paramètres de validation obtenus l'étude de la linéarité

|  | Dexaméthasone | Hydrochlorothiazide | Phénytoïne | Spironolactone |
|--|---------------|---------------------|------------|----------------|
| <b>Etendue de la gamme de calibration (mg/mL)</b>      | 1.25–10       | 1,2–2,8             | 1.25–10    | 1.25–10        |
| <b>r<sup>2</sup></b>                                   | 0.9996        | 0.9996              | 0.9998     | 0.9992         |
| <b>Ecart maximal des résidus (%)</b>                   | 5.0           | 2.4                 | 3.5        | 5.0            |
| <b>Ratio signal sur bruit au point bas de la gamme</b> | 438           | 138                 | 349        | 164            |

Concernant la précision et la justesse, les critères d'acceptabilité ont été atteints pour les 4 méthodes analytiques développées. En effet, les coefficients de variations étaient tous inférieurs ou égaux à 4,4% tandis que les taux de recouvrement des CQ étaient proches de 100% des valeurs attendues (Tableau 32). La limite de quantification était de 1,25 mg/mL pour la dexaméthasone, la phénytoïne et la spironolactone, et de 1,20 mg/mL pour l'hydrochlorothiazide. Ces résultats démontrent que les méthodes analytiques développées sont exactes et permettent une détermination fiable des teneurs en dexaméthasone, phénytoïne, spironolactone et hydrochlorothiazide dans les suspensions buvables fabriquées à partir du Syrspond® SF PH4 Dry.

Tableau 32: Paramètres de validation obtenus durant l'évaluation de l'exactitude des méthodes analytiques

|                                      | Spironolactone                 | Dexaméthasone  | Hydrochlorothiazide | Phénytoïne     |
|--------------------------------------|--------------------------------|----------------|---------------------|----------------|
| <b>Concentration cible (mg/mL)</b>   | 5.0                            | 5.0            | 2.0                 | 5.0            |
| <b>Concentration moyenne (mg/mL)</b> | <i>Répétabilité</i>            |                |                     |                |
|                                      | 4.9                            | 5.0            | 2.0                 | 5.0            |
| <b>Coefficient de variation (%)</b>  | 4.4                            | 1.3            | 3.6                 | 4.0            |
| <b>IC 95% (%)</b>                    | [4.2 ; 4.7]                    | [1.3 ; 1.4]    | [3.5 ; 3.6]         | [1.9 ; 6.0]    |
| <b>Concentration moyenne (mg/mL)</b> | <i>Précision intermédiaire</i> |                |                     |                |
|                                      | 5.0                            | 4.9            | 2.0                 | 5.0            |
| <b>Coefficient de variation (%)</b>  | 3.0                            | 3.2            | 4.0                 | 3.1            |
| <b>IC 95% (%)</b>                    | [2.9 ; 3.1]                    | [3.1 ; 3.3]    | [3.9 ; 4.0]         | [2.3 ; 3.8]    |
| <b>Recouvrement (%)</b>              | <i>Justesse</i>                |                |                     |                |
|                                      | 100.5                          | 98.8           | 99.8                | 99.7           |
| <b>IC 95% (%)</b>                    | [99.0 ; 102.0]                 | [97.3 ; 100.4] | [97.8 ; 101.7]      | [98.2 ; 101.2] |

IC 95% : intervalle de confiance à 95%

Durant l'étude de dégradation forcée, plusieurs produits de dégradation ont été formés et détectés (Figure 16, Figure 17,

Figure 18 et Figure 19) mais aucun n'a interféré avec le pic chromatographique des différents principes actifs, que ce soit en termes de temps de rétention (résolution des pics toujours supérieurs à 1,5) ou sur l'analyse des spectres UV et des tests de pureté (Tableau 33). Etant donné la linéarité et l'exactitude de toutes les méthodes, et que aucun produit de dégradation ne co-élut avec les principes actifs, ces méthodes sont donc considérées comme indicatrice de stabilité et peuvent être utilisées pour déterminer les teneurs en principes actifs sans interférences issues de produits de dégradation [241].

Figure 16: Chromatogrammes 3D obtenus pour les suspensions buvables de dexaméthasone (DEX) après application de différentes conditions de stress. (a) Pas de stress; (b) HCl 0,5M à 80°C pendant 30 minutes; (c) NaOH 0,1M à 80°C pendant 10 minutes; (d) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% à 80°C pendant 4 heures; (e) 80°C pendant 4 heures. SF : front de solvant ; DP : produit de dégradation

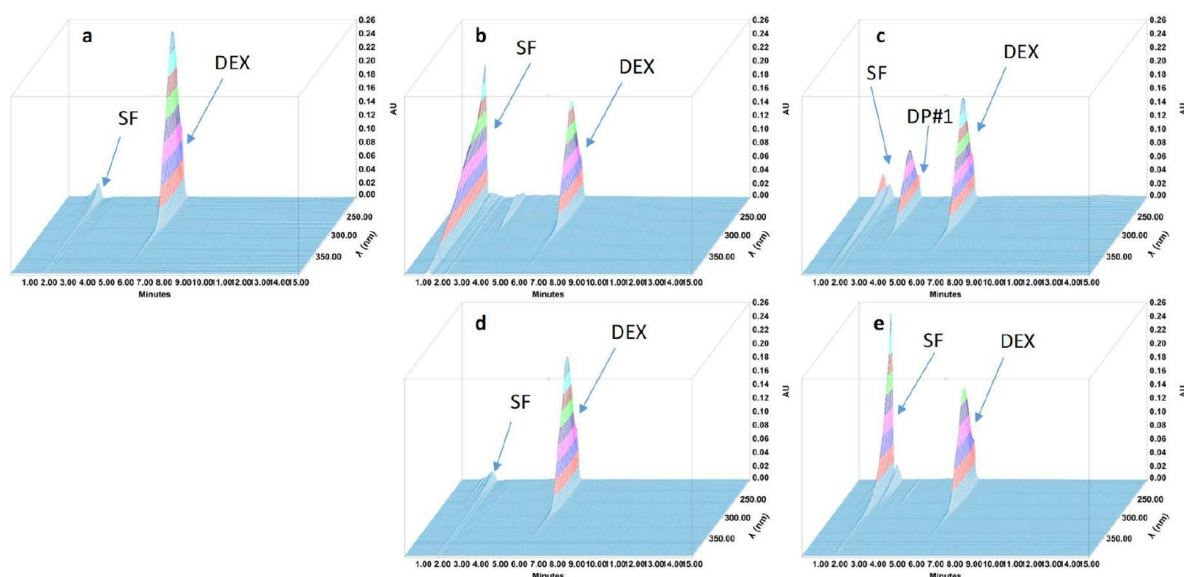


Figure 17: Chromatogrammes 3D obtenus pour les suspensions buvables d'hydrochlorothiazide (HCTZ) après application de différentes conditions de stress. (a) Pas de stress; (b) HCl 1M à 80°C pendant 1 heure; (c) NaOH 1M à 80°C pendant 1 heure; (d) H2O2 3% à 80°C pendant 4 heures; (e) 80°C pendant 4 heures. SF : front de solvant; DP : produit de dégradation

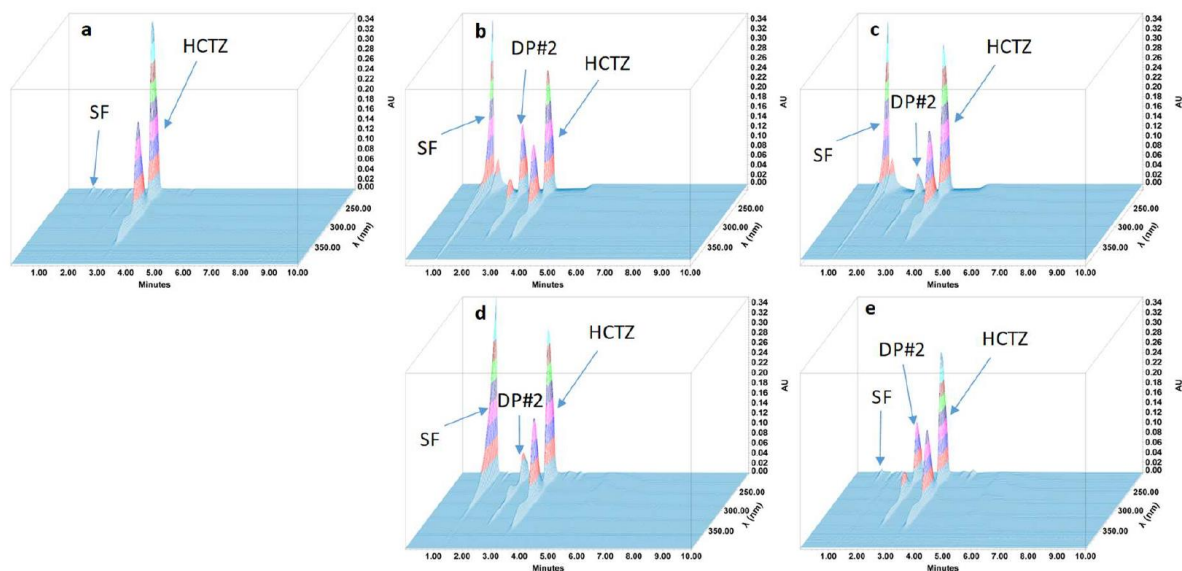


Figure 18: Chromatogrammes 3D obtenus pour les suspensions buvables de phénytoïne (PHT) après application de différentes conditions de stress. (a) Pas de stress; (b) HCl 0,5M à 80°C pendant 4 heures; (c) NaOH 1M à 80°C pendant 4 heures; (d) H2O2 3% à 80°C pendant 4 heures; (e) 80°C pendant 4 heures. SF : front de solvant; DP : produit de dégradation

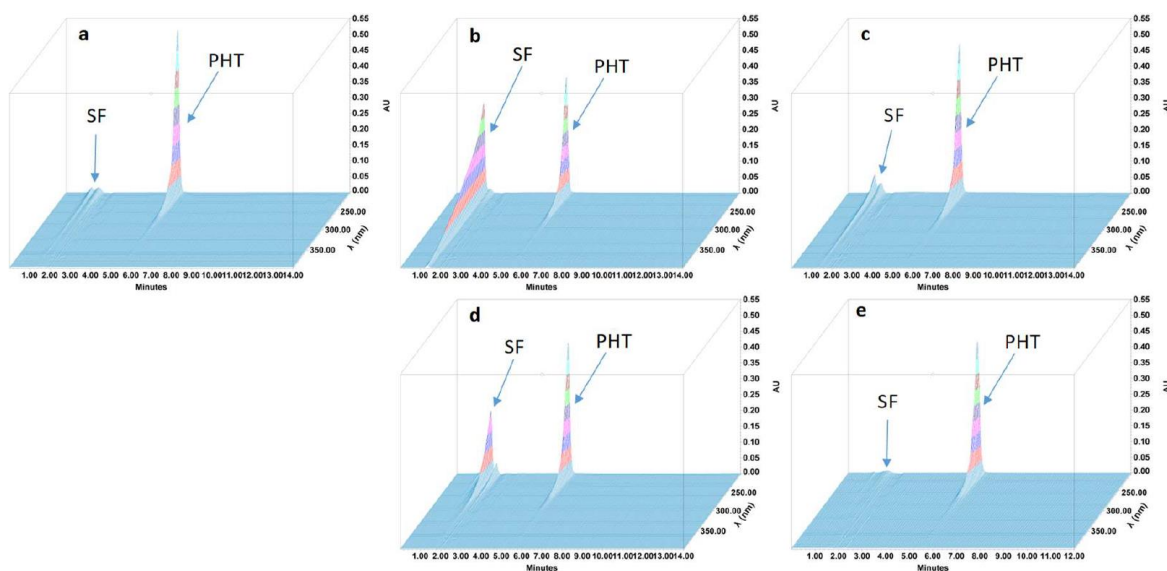


Figure 19: Chromatogrammes 3D obtenus pour les suspensions buvables de spironolactone (SPL) après application de différentes conditions de stress. (a) Pas de stress; (b) HCl 0,5M à 80°C pendant 1 heure; (c) NaOH 0,1M à 80°C pendant 5 minutes; (d) H2O2 3% à 80°C pendant 4 heures; (e) 80°C pendant 4 heures. SF : front de solvant; DP : produit de dégradation

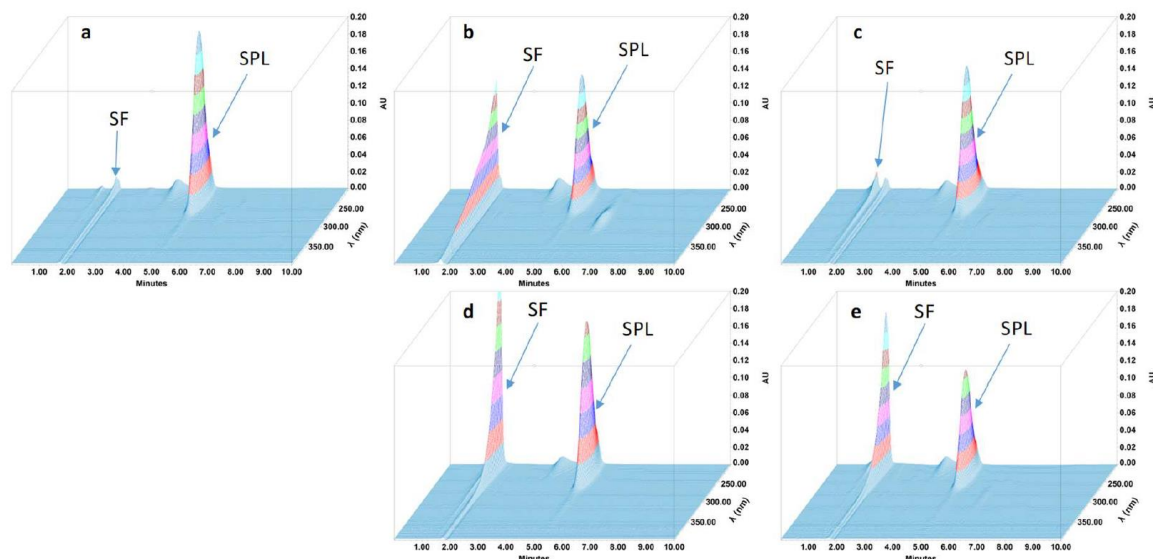


Tableau 33: Caractéristiques associées aux chromatogrammes 3D obtenus durant l'étude de dégradation forcée.

|                                  | Temps de rétention (min)                         | Temps de rétention relatif | Facteur d'étalement | Résolution | Nombre de plateaux théoriques |
|----------------------------------|--|----------------------------|---------------------|------------|-------------------------------|
| <b>Dexaméthasone</b>             | 6.2  | NA                         | 1.03                | NA         | 6797                          |
| <i>Produit de dégradation #1</i> | 3.2  | 0.52                       | 1.12                | 12.74      | 6018                          |
| <b>Hydrochlorothiazide</b>       | 3.12   | NA                         | 1.16                | NA         | 5399                          |
| <i>Produit de dégradation #2</i> | 2.25   | 0.72                       | 1.18                | 6.06       | 5713                          |
| <b>Phénytoïne</b>                | 5.44   | NA                         | 1.17                | NA         | 6240                          |
|                                  | Produits de dégradation dans le front de solvant |                            |                     |            |                               |
| <b>Spironolactone</b>            | 5.23   | NA                         | 1.16                | NA         | 2547                          |
|                                  | Produits de dégradation dans le front de solvant |                            |                     |            |                               |

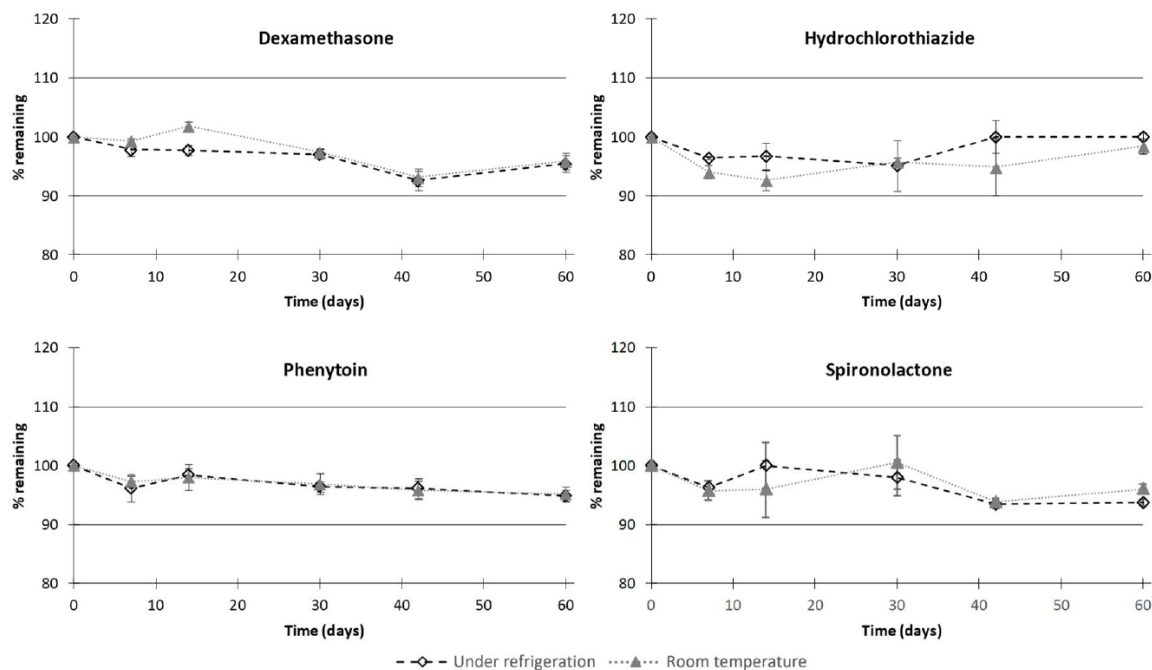
### 3.2. Etudes de faisabilité et de stabilité

Immédiatement après la réalisation des préparations, les concentrations moyennes des suspensions buvables étaient de  $4,70 \pm 0,10$  mg/mL,  $2,0 \pm 0,04$  mg/mL,  $4,91 \pm 0,10$  mg/mL, et  $4,74 \pm 0,06$  mg/mL

pour la dexaméthasone, l'hydrochlorothiazide, la phénytoïne, et la spironolactone, respectivement. Cela montre que la perte en principe actif durant la préparation était minimale.

Concernant la stabilité chimique, aucune dégradation significative des quatre principes actifs n'a été observé dans les préparations finies, quel que soit le type de conditions de stockage utilisé (Figure 20). En effet, sur la période d'essai, la proportion restante de la concentration initiale en principe actif était toujours supérieure à 90%, démontrant que ces suspensions buvables sont stables chimiquement jusqu'à 60 jours dans des conditions de stockage classiques (à  $5 \pm 3$  °C ou à  $22 \pm 4$  °C). En accord avec ces résultats, aucun produit de dégradation n'a été observé sur la période de l'étude. Enfin, pour tous les échantillons, la concentration en principe actif est toujours restée dans un intervalle compris entre 90 et 110% de la concentration cible, démontrant l'uniformité des préparations au cours du temps.

Figure 20: Stabilité chimique de la dexaméthasone, l'hydrochlorothiazide, la phénytoïne et la spironolactone dans les suspensions buvables. Les valeurs sont exprimées en pourcentage moyen restant  $\pm$  écart-type.



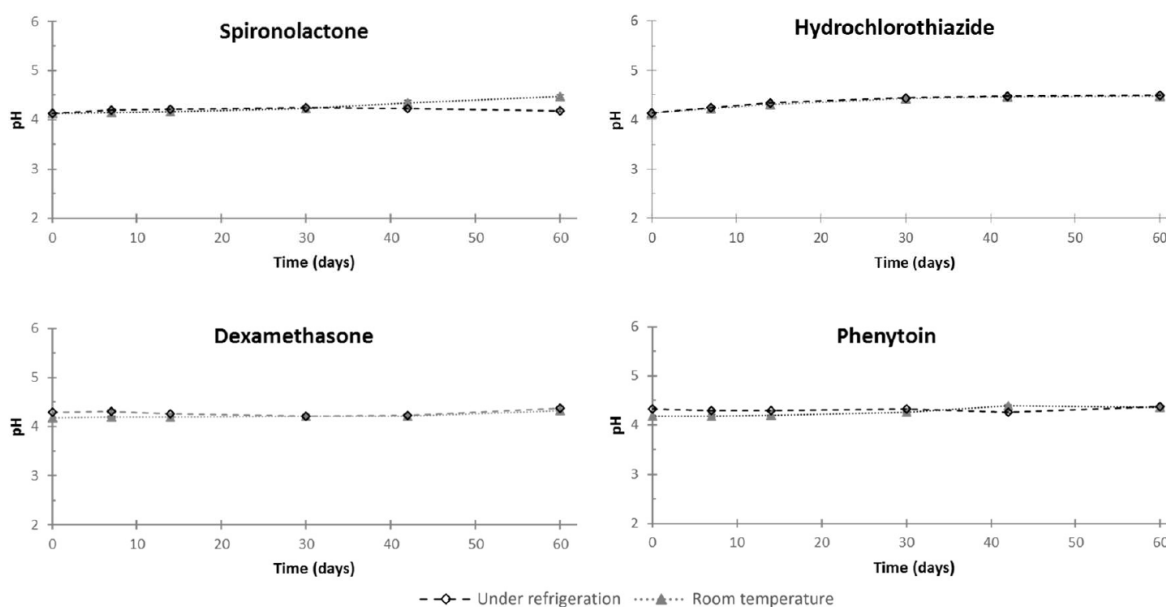
Concernant l'étude de stabilité physique, aucune modification de couleur n'a eu lieu et aucun précipité n'a été observé sur la période d'essai (Tableau 34).

Tableau 34: Paramètres physiques évalués durant l'étude de stabilité, quel que soit le type de condition de stockage (réfrigéré ou température ambiante)

|                            | Couleur          |                  | Précipité | Osmolalité (mOsm/kg) |         |
|----------------------------|------------------|------------------|-----------|----------------------|---------|
|                            | Jour 0           | Jour 60          | Jour 60   | Jour 0               | Jour 60 |
| <b>Dexaméthasone</b>       | Blanc opalescent | Blanc opalescent | non       | <LOQ                 | <LOQ    |
| <b>Hydrochlorothiazide</b> | Blanc opalescent | Blanc opalescent | non       | <LOQ                 | <LOQ    |
| <b>Phénytoïne</b>          | Blanc opalescent | Blanc opalescent | non       | <LOQ                 | <LOQ    |
| <b>Spirolactone</b>        | Blanc opalescent | Blanc opalescent | non       | <LOQ                 | <LOQ    |

Le pH des suspensions est resté stable (moins de 0,4 unité de pH en variation) (Figure 21) et aucune variation significative d'osmolalité n'est apparue durant l'étude (moins de 100 mOsm/kg) (Tableau 34).

Figure 21: Modifications de pH pour les suspensions de dexaméthasone, hydrochlorothiazide, phénytoïne et spirolactone, quel que soit la condition de stockage. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type.



De façon générale, ces résultats attestent de la stabilité physique et chimique de ces quatre suspensions buvables, sur une durée de 60 jours et quel que soit la condition de stockage.

#### 4. DISCUSSION

Une méthode HPLC-UV a été développée pour chaque principe actif et validée selon les recommandations internationales. Ces méthodes indicatrices de stabilités sont adaptées pour investiguer la stabilité physicochimique de la dexaméthasone, l'hydrochlorothiazide, la phénytoïne et la spironolactone dans des préparations réalisées avec un vecteur de suspension buvable, le Syrspend® SF PH4 Dry. De plus, ces méthodes sont simples à implémenter et rapides d'utilisation, permettant de les utiliser pour réaliser en routine des contrôles libératoires pour la libération pharmaceutique de ces préparations.

Afin de pouvoir utiliser un volume adéquat de suspension buvable (préférentiellement moins de 1 mL chez le nouveau-né), en relation avec les posologies requises [224,226,243], nous avons choisi de préparer des suspensions buvables à une concentration cible de 5 mg/mL pour la dexaméthasone, la phénytoïne et la spironolactone, et de 2 mg/mL pour l'hydrochlorothiazide. Les données de la littérature rapportent des concentrations similaires pour les préparations orales liquides utilisant les mêmes principes actifs [228,231,233]. Certains auteurs ont proposé des concentrations inférieures mais pour des indications différentes [230,232], ou bien supérieures mais destinées à des enfants plus âgés [227,229].

Dexaméthasone, hydrochlorothiazide, phénytoïne et spironolactone sont des molécules hydrophobes qui présentent une faible solubilité dans l'eau, et qui sont donc inadaptées pour la préparation de solutions à des concentrations adaptées pour les indications à traiter. En conséquence, nous avons dû préparer des suspensions afin de pouvoir fournir des formes galéniques orales liquides adaptés. Un des risques majeurs associé à ces formes galéniques est le risque d'inhomogénéité, pouvant ainsi provoquer des variations des doses prélevées. Ainsi, les suspensions doivent être agitées avant utilisation afin d'assurer une bonne remise en suspensions des principes actifs et éviter une variabilité des doses prélevées avant administration. Néanmoins, étant donné les résultats de l'étude de faisabilité, l'homogénéité des principes actifs dans les suspensions a été démontrée puisque les concentrations en principes actifs dans les préparations ne se sont jamais écartées de plus de 8% de la valeur cible. Ces résultats démontrent donc que ces suspensions buvables, formulées avec du Syrspend® SF PH4 Dry comme véhicule de suspension, offrent une teneur fiable pour les quatre principes actifs.

De plus, ces suspensions présentent une faible osmolalité (<100 mOsm/kg) comparée à d'autres formulations (environ 1600 mOsm/kg) [227,228,230], assurant ainsi une administration sécurisée chez le nouveau-né. En effet, une osmolalité importante, supérieure à 450 mOsm/kg, peut entraîner des entérocolites nécrosantes chez le nouveau-né, notamment chez les prématurés [244].

Quel que soit la condition de stockage, la proportion de la concentration initiale en principe actif est resté dans les limites fixées par la Pharmacopée US [240], démontrant que ces suspensions étaient stables jusqu'à 60 jours, que ce soit à température ambiante ou bien sous réfrigération. Ces résultats sont similaires ou supérieurs à ceux rapportés dans la littérature [227–233]. La stabilité physicochimique de nos quatre suspensions buvables n'a pas été étudiée sur une période supérieure à 60 jours car la stabilité microbiologique des suspensions utilisant le Syrspend® SF PH4 Dry n'a été démontrée par le fournisseur que sur cette durée [245]. Toutefois, étant donné que les formulations ne contiennent aucuns conservateurs, il est préférable de recommander de stocker ces suspensions à température réfrigérée, afin de limiter le risque de pousse microbienne.

Les jeunes enfants, et *a fortiori* les nouveau-nés, sont particulièrement vulnérables aux EEN en raison de l'immaturation de leurs organes, de la modification des pharmacocinétiques et depuis que certains de ces excipients peuvent influencer le développement des organismes [246,247]. Plusieurs études ont démontré que les nouveau-nés reçoivent un nombre significatif d'EEN rendant d'autant plus important l'exploration de solutions de substitution [161,248]. A notre connaissance, l'étude présentée ici est la première à démontrer la faisabilité de préparations de suspensions buvables de dexaméthasone, d'hydrochlorothiazide, de phénytoïne ou de spironolactone en utilisant uniquement des excipients sans effets notoires.

Les véhicules utilisés pour la préparation de suspensions buvables de beaucoup de principes actifs décrits dans la littérature, incluant la dexaméthasone, l'hydrochlorothiazide, la phénytoïne et la spironolactone, contiennent des excipients à effet notoire, notamment des conservateurs. En effet, étant donné que ces préparations liquides présentent un risque d'instabilité microbiologique, des conservateurs peuvent être ajoutés. Parmi eux, les parabènes sont les plus largement utilisés car ils sont considérés comme sûrs, peu chers, inertes et sans goût ni odeur [118]. Néanmoins, ces composés sont connus pour se lier aux récepteurs aux œstrogènes, ce qui leur confère des propriétés de perturbations endocriniennes [249]. De plus, l'exposition précoce aux PE a été identifiée comme un problème majeur concernant la santé infantile [169,170]. Au vu de ces éléments, l'Agence Européenne du Médicament recommande de limiter voire d'éviter l'utilisation des parabènes dans les médicaments, notamment lorsqu'ils sont destinés à être utilisés dans la population pédiatrique [154]. Ici aussi, il s'agit, à notre connaissance, de la seule étude qui démontre la stabilité physicochimique de préparations orales liquides contenant de la dexaméthasone, de l'hydrochlorothiazide, de la phénytoïne et de la spironolactone et formulées sans conservateurs tels que les parabènes. La démonstration de cette stabilité est importante car l'absence de conservateurs peut influencer la stabilité chimique d'une molécule, en raison de leurs propriétés antioxydantes [237].



En conclusion, les données issues de cette étude démontrent que la préparation de formes galéniques orales liquides sans EEN est possible, au moins pour les principes actifs testés : dexaméthasone, hydrochlorothiazide, phénytoïne et spironolactone. De plus, la stabilité physicochimique de ces formulations correspond à l'usage attendu pour un usage clinique dans la population pédiatrique, nouveau-nés y-compris. Même si la stabilité microbiologique des préparations réalisées avec le Syrspend® SF PH4 Dry a été testée par le fournisseur, il convient de vérifier cette stabilité, notamment « en vie réelle », pour les 4 molécules testées dans l'étude.

Pour finir, l'utilisation de ces suspensions buvables offre une solution fiable pour réduire l'exposition des enfants, notamment des nouveau-nés, aux EEN et en particulier les excipients présentant des propriétés perturbatrices endocriniennes tels que les parabènes.

# **DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION**

Les nouveau-nés constituent une population particulièrement à risque concernant l'exposition aux perturbateurs endocriniens. A la fois dans le cadre de l'hypothèse DOHAD qui précise que l'exposition prénatale et périnatale à ces composés est un facteur de risque de développer des maladies chroniques, et car cette population est à risque de surexposition en raison de l'immaturation du métabolisme qui les caractérise. Par ailleurs, les nouveau-nés sont exposés à divers perturbateurs endocriniens, dont les parabènes, via différentes sources d'exposition : l'alimentation, les cosmétiques mais également les médicaments.

Nos travaux ont pour objectifs d'étudier l'exposition aux parabènes des nouveau-nés via les médicaments qu'ils reçoivent durant l'hospitalisation faisant suite à leur naissance et de mettre en place des actions permettant de limiter cette exposition. Deux approches complémentaires ont été mises en œuvre, la première consiste à étudier les prescriptions d'une cohorte de nouveau-nés afin d'identifier les médicaments contenant des parabènes ainsi que la prévalence et la quantité d'exposition des nouveau-nés aux parabènes. La deuxième consiste à identifier, à partir de ces prescriptions, les stratégies de prise en charge alternatives permettant de réduire cette exposition. Enfin, nous avons mis au point une méthode de dosage des parabènes dans le plasma des nouveau-nés afin de pouvoir identifier la part attribuable aux médicaments dans l'exposition globale de cette population.

## **1. EXPOSITION DES NOUVEAU-NES AUX PARABENES VIA L'ADMINISTRATION DES MEDICAMENTS**

La plupart des études ayant porté sur l'exposition des nouveau-nés aux parabènes n'étaient pas spécifiquement dédiées à cette question puisqu'elles étudiaient les excipients à effets notoires de façon générale [158–161]. De plus, trois d'entre elles étaient rétrospectives et monocentriques, une seule était prospective et multicentrique. En conséquence, ces études n'ont pu fournir que des données de prévalence et aucune quantification de cette exposition n'a été réalisée. Une seule étude s'est intéressée spécifiquement à cette question et a démontré que les nouveau-nés étaient exposés de façon journalière à 0,58 mg/kg de méthylparabène et 0,14 mg/kg de propylparabène.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressées à l'exposition des nouveau-nés aux parabènes via l'administration des médicaments. Nous avons mené une étude de grande ampleur, à la fois en nombre de nouveau-nés inclus, de centres et en durée, afin de pouvoir estimer précisément la prévalence d'exposition et les quantités journalières moyennes d'exposition aux parabènes.

Nos résultats montrent que plus d'un nouveau-né sur deux est exposé à ces perturbateurs endocriniens via les médicaments qu'ils reçoivent. Cette fréquence est inversement proportionnelle à l'âge gestationnel à la naissance. Ainsi, plus de 80% des nouveau-nés prématurés de moins de 28 SA sont exposés via cette source alors que 48% des nouveau-nés à terme le sont. De plus, la durée d'exposition est également plus longue en fonction de la même variable. Les nouveau-nés prématurés sont donc plus à risque d'être exposés que les nouveau-nés à terme et sur des périodes plus importantes. Ainsi, nos travaux mettent en évidence les enjeux majeurs de l'exposition des nouveau-nés hospitalisés aux parabènes via l'administration des médicaments.

Ces données sont les seules à évaluer ce risque de façon spécifique sur une population importante et en prenant en compte les variations d'exposition des nouveau-nés hospitalisés pris en charges sur le territoire français. L'analyse des fréquences de prescription entre les différents centres montre que l'exposition aux parabènes via les médicaments n'est pas homogène, que ce soit en termes de prévalence ou de quantité reçue. Certains centres exposent leurs nouveau-nés de façon plus importante et durable que d'autres. Ces différences peuvent être dues à la prise en charge de pathologies différentes suivant les centres, en lien avec le niveau de soins qu'ils assurent (niveau 1, 2 ou 3). Cependant, même au sein de centres de niveau de prise en charge équivalent on peut retrouver des différences importantes d'exposition aux parabènes. Ce résultat peut s'expliquer par l'utilisation de spécialités contenant plus ou moins de parabènes pour une même prise en charge ou par le choix d'une stratégie thérapeutique différente d'un établissement à l'autre.

Parmi l'ensemble des médicaments identifiés comme contenant des parabènes, 34 ont été prescrits dans cette étude, dont 4 préparations pharmaceutiques, alors qu'au total 287 DCI ont été utilisées. Ce nombre restreint de médicaments participant à l'exposition des nouveau-nés souligne qu'il est possible de mener des actions afin de limiter l'exposition de cette population aux parabènes.

## **2. LE DEFI DES ALTERNATIVES**

Dans la dernière partie de cette thèse, nous avons exploré les possibilités de substitution et de prises en charge alternatives des médicaments contenant des parabènes prescrits chez les nouveau-nés. Les résultats montrent qu'il n'existe pas de solution unique pour remplacer ces médicaments et ainsi limiter l'exposition des nouveau-nés à ces perturbateurs endocriniens. Au final, tous les maillons de la chaîne du circuit du médicament sont concernés : médecins, pharmaciens, autorités de santé et industrie pharmaceutique.

En effet, les pharmaciens doivent faire évoluer leurs pratiques de référencement des médicaments pour prendre en compte la présence des parabènes, et celles des excipients à effets notoires de façon générale. A minima, ces critères devraient faire partie des appels d'offres de médicaments déposés par les établissements de santé. L'exemple-type de cette situation est celui du paracétamol pour lequel deux spécialités buvables existent, l'une contenant des parabènes, l'autre non.

Dans certaines prises en charge, il n'est pas possible de proposer une thérapeutique alternative sans parabènes. Par exemple, pour la prévention de la transmission materno-fœtale du VIH, l'utilisation de certaines spécialités dont la formulation contient des parabènes fait l'objet de recommandations et ne peut donc pas être substituée. Dans ces situations où ni prise en charge ou référencement alternatifs ne sont possibles, seuls les industriels peuvent proposer de nouvelles formulations adaptées. Nos résultats doivent inciter les autorités de santé à réglementer plus strictement la présence des parabènes dans les médicaments pour provoquer un changement de paradigme au niveau des laboratoires pharmaceutiques.

Dans d'autres situations, l'absence des indications de prescriptions n'a pas permis de proposer d'alternatives aux médicaments prescrits contenant des parabènes. C'est notamment le cas des antibiotiques pour lesquels les indications de prescription sont diverses. C'est la principale limite de notre étude, certaines spécialités peuvent être prescrites pour des indications différentes et les possibilités de substitution peuvent donc varier selon les situations. Cela limite de fait la possibilité de proposer des stratégies de prise en charge moins exposantes en parabènes.

De même, pour certaines des spécialités identifiées, le nombre de centres utilisateurs était particulièrement restreint, ainsi que le nombre de prescriptions associées. Ces utilisations ponctuelles peuvent être dues à des pathologies rares ou encore à des spécificités de prise en charge locale. C'est par exemple le cas de la Dépakine® ou encore du Théralène®. Là encore, l'absence d'indication clairement identifiable ne permet pas en l'état de proposer une alternative sans parabènes. Afin de répondre à ces impasses, il est nécessaire d'investiguer les différentes situations pour identifier les indications précises pour lesquelles la prescription d'un médicament contenant des parabènes a été nécessaire. Pour chacune, un groupe d'experts, composé de pédiatres et de pharmaciens, sera réuni afin d'émettre des recommandations de prise en charge de ces pathologies faisant appel à des spécialités sans parabènes ou d'identifier le besoin de recourir au développement de spécialités sans parabènes par les industriels.

Concernant les préparations pharmaceutiques, quatre ont été identifiées comme apportant des parabènes. Dans tous les cas, il s'agissait de préparations orales liquides utilisant un vecteur de

suspension commercial, le mélange OraPlus®/OraSweet®. La formulation de ce vecteur fait apparaître la présence de méthyle et de propylparabène. En effet, les formes galéniques liquides sont plus sensibles à la croissance bactérienne, d'autant plus dans le cas de formes multidoses. Toutefois, il existe d'autres vecteurs de suspension commerciaux dont la formulation ne contient pas de parabènes, tels que l'Inorpha®, le Syrspend® SF PH4 et le Syrspend® ALKA. L'utilisation de ces vecteurs offre une solution satisfaisante pour les pharmaciens afin de réaliser des préparations sans parabènes, à condition que la stabilité physicochimique des principes actifs utilisés soit démontrée.

Au final, parmi les spécialités et préparations identifiées dans cette thèse comme contenant des parabènes et prescrits chez les nouveau-nés, nous proposons des stratégies alternatives pour dix d'entre elles (Tableau 35).

*Tableau 35: Propositions de stratégies alternatives aux médicaments contenant des parabènes*

| <b>Solution proposée</b>   | <b>Spécialités concernés</b>  |
|--|---|
| <b>Présence d'alternatives commercialisées</b>                                       | Ferrostrane® 0,68% sirop<br>Doliprane® 2,4% solution buvable<br>Levocarnil® 100 mg/mL solution buvable<br>Un-Alfa® solution buvable<br>Vedrop® 50 mg/mL suspension buvable<br>Propranolol Rosemont 1 mg/mL solution buvable<br>Locapred® 0,1% crème   |
| <b>Présence d'alternatives commercialisées et/ou de préparations pharmaceutiques</b> | Gaviscon® suspension buvable<br>Lasilix® 10 mg/mL suspension buvable<br>Flagyl® 25 mg/mL suspension buvable   |
| <b>Etude des indications nécessaires pour proposer une alternative</b>               | Gentamicine injectable (10/40/80 mg)<br>Josacine® suspension buvable (125 et 250 mg)<br>Kepra® 100 mg/mL solution buvable<br>Digoxine® 50 µg/mL solution buvable<br>Rifadine® 2% suspension buvable<br>Bactrim® suspension buvable<br>Oracilline® 50000 UI/mL suspension buvable<br>Théralène® 4% solution buvable<br>Depakine® sirop |
| <b>Evolution des formulations par l'industrie pharmaceutique</b>                     | Mycostatine® 100000 UI/mL suspension buvable<br>Fungizone® 10% suspension buvable<br>Epivir® 10 mg/mL solution buvable<br>Viramune® 10 mg/mL suspension buvable<br>Dompéridone 1 mg/mL suspension buvable   |

Les recommandations issues de notre étude et celles émises par le groupe d'experts devront par la suite être diffusées auprès des prescripteurs et des pharmaciens voire même implémentées dans les bases de données des logiciels de prescription. Cette mise en place au plus près des cliniciens

permettra d'initier une action forte et adaptée aux enjeux majeurs que soulève la présence de parabènes dans les médicaments susceptibles d'être prescrits chez les nouveau-nés.

### **3. VERS L'ÉVALUATION DE LA PART ATTRIBUABLE AUX MÉDICAMENTS : LE PROJET EXEMPT**

Si les médicaments sont très assurément des sources d'exposition aux parabènes, il est toutefois nécessaire d'évaluer quel est leur part attribuable, vis-à-vis des autres sources d'exposition, dans l'exposition à ces composés. Chez le nouveau-né, une seule étude a rapporté l'évolution des concentrations plasmatiques en parabènes après administration de médicaments contenant ces perturbateurs endocriniens [162]. Les auteurs ont mesuré les concentrations plasmatiques en parabènes chez des nouveau-nés, après administration de médicaments, afin d'estimer les paramètres pharmacocinétiques des parabènes dans cette population. Leurs résultats montrent que l'administration répétée de médicaments contenant des parabènes entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques de ces composés. Néanmoins, étant donné le design de leur étude, les auteurs ne peuvent pas différencier clairement l'impact des médicaments vis-à-vis des autres sources d'exposition. De plus, la méthode de dosage utilisée n'est pas assez sensible puisque plus de la moitié des échantillons avait des résultats inférieurs à la LOD pour le propylparabène. Toutefois, malgré ces limites, la comparaison des résultats de cette étude avec ceux obtenus sur sang de cordon [164] montre que les concentrations plasmatiques en parabènes chez les nouveau-nés durant leur hospitalisation sont plus élevées qu'à la naissance.

Afin d'évaluer la part attribuable au médicament dans l'exposition des nouveau-nés, notamment les nouveau-nés prématurés, aux parabènes, nous souhaitons mettre en œuvre une étude prospective multicentrique observationnelle évaluant les concentrations plasmatiques en parabènes dans deux groupes :

- Un groupe non-exposé : nouveau-nés prématurés ne recevant pas de médicaments contenant des parabènes ;
- Un groupe exposé : nouveau-nés prématurés recevant des médicaments contenant des parabènes.

Afin de mener à bien cette étude, nous avons développé et validé une méthode de dosage permettant de doser de façon fiable les parabènes dans le plasma des nouveau-nés. Certains choix méthodologiques ont été faits, notamment d'utiliser une matrice biologique dont le prélèvement est invasif et de ne doser que les composés parents et non les métabolites. En effet, la plupart des

méthodes de dosage des parabènes font appel à des méthodes de déconjugaison permettant de transformer les métabolites conjugués en composés parents [163,164,196,197,200,201]. Néanmoins, cette approche méthodologique possède différentes limites :

- Comme évoqué dans la discussion de la méthode de dosage, ces méthodes de déconjugaison ne sont pas équivalentes entre elles, rendant impossible la comparaison des résultats de différentes études [129] ;
- Concernant le métabolisme des parabènes, ils sont majoritairement hydrolysés en pHBA et les métabolites conjugués sont minoritaires. Ces voies métaboliques sont sujettes à variation interindividuelle et est mal connue chez les nouveau-nés, et notamment les nouveau-nés prématurés ;
- De plus, les métabolites identifiés des parabènes n'ont pas démontré d'effets toxiques, au contraire d'autres perturbateurs endocriniens. Dans ce cas, la déconjugaison des métabolites n'apporte pas d'informations pertinentes sur l'exposition au composé toxique et peut perturber la mesure de l'exposition en confondant composé toxique et non toxique.

Ces limites justifient notre choix de ne pas appliquer de méthode de déconjugaison et de se focaliser uniquement sur le composé parent. Concernant le choix de la matrice biologique, ce choix est décrit et justifié dans la discussion du chapitre de la méthode de dosage.

Dans le cadre l'étude comparative, nous prévoyons de récupérer les prélèvements sanguins réalisés dans la pratique courante des soins. Le développement de la méthode de dosage avec un faible volume d'échantillon permet de ne pas prélever de tubes supplémentaires pour réaliser l'étude et donc de se limiter à un cadre de recherche de type I de la loi Jardé, c'est-à-dire observationnelle.

Les résultats nous permettront de déterminer précisément l'impact de l'administration des médicaments sur l'exposition aux parabènes des nouveau-nés, vis-à-vis des autres sources d'exposition. De plus, ces données nous permettront également de déduire les caractéristiques pharmacocinétiques de ces composés dans cette population. Afin d'identifier les facteurs pouvant faire varier les concentrations en parabènes, une analyse multivariée sera menée (type de nutrition, âge, dose moyenne de parabènes administrée, intervalle de temps entre administration des médicaments contenant des parabènes et prélèvement...).





## 4. CONCLUSION

Les travaux présentés dans cette thèse démontrent que les médicaments sont des sources importantes d'exposition aux parabènes chez les nouveau-nés, et d'autant plus les nouveau-nés prématurés. Ce risque doit être pris en compte pour rétablir la balance bénéfice/risque des médicaments identifiés comme contenant des parabènes lorsqu'ils sont utilisés dans cette population, notamment au regard de la sensibilité augmentée des nouveau-nés aux perturbateurs endocriniens.

L'éviction des parabènes des médicaments utilisés chez les nouveau-nés doit faire appel à une stratégie multidisciplinaire associant médecins pour les prises en charge, pharmaciens pour la sensibilisation aux excipients ayant des propriétés perturbatrices endocriniennes et à effets notoires en général, et enfin aux autorités de santé et à l'industrie pharmaceutique pour interdire les parabènes dans ces médicaments et concevoir des nouvelles formulations exemptes de parabènes.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Centre canadien d'hygiène et de santé au travail. Perturbateurs du système endocrinien : Réponses SST. 2020. <https://www.cchst.ca/> (accessed 14 Sep 2020).
- 2 The Wingspread Conference - Chemically-Induced Alterations in Sexual Development: The Wildlife/Human Connection. 1991.
- 3 Bowerman WW, Best DA, Grubb TG, *et al.* Assessment of environmental endocrine disruptors in bald eagles of the Great Lakes. *Chemosphere* 2000;**41**:1569–74. doi:10.1016/S0045-6535(00)00014-X
- 4 Guillette LJ, Gross TS, Masson GR, *et al.* Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* 1994;**102**:680–8.
- 5 Guillette Jr. LJ, Pickford DB, Crain DA, *et al.* Reduction in Penis Size and Plasma Testosterone Concentrations in Juvenile Alligators Living in a Contaminated Environment. *Gen Comp Endocrinol* 1996;**101**:32–42. doi:10.1006/gcen.1996.0005
- 6 WHO. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. [https://www.who.int/ipcs/publications/new\\_issues/endocrine\\_disruptors/en/](https://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/) (accessed 18 Oct 2020).
- 7 Commission Européenne. COMMUNICATION DE LA COMMISSION AU PARLEMENT EUROPÉEN ET AU CONSEIL sur les perturbateurs endocriniens et les projets d'actes de la Commission visant à définir des critères scientifiques pour leur détermination dans le cadre de la législation de l'UE relative aux produits phytopharmaceutiques et aux produits biocides. 2016. [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine\\_disruptors/docs/com\\_2016\\_350\\_fr.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/com_2016_350_fr.pdf) (accessed 19 Sep 2020).
- 8 Commission Européenne. Community Strategy for Endocrine Disruptors. 1999. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:1999:0706:FIN:EN:PDF> (accessed 19 Sep 2020).
- 9 Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption. [https://ec.europa.eu/environment/archives/docum/pdf/bkh\\_main.pdf](https://ec.europa.eu/environment/archives/docum/pdf/bkh_main.pdf) (accessed 6 Jun 2020).
- 10 Study on enhancing the Endocrine Disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals. 2007. [https://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/final\\_report\\_2007.pdf](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/final_report_2007.pdf) (accessed 14 Sep 2020).
- 11 Bergman Å, Heindel J, Jobling S, *et al.* *State of the science of endocrine disrupting chemicals, 2012*. 2012. doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.020
- 12 Inserm. Expertise collective-Reproduction et environnement. 2011.
- 13 Multigner L. Perturbateurs endocriniens : d'où viennent-ils ? où va-t-on ? – Endocrine disruptors. *Métabolismes Horm Diabète Nutr* 2007;**6**.

- 14 Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, *et al.* Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* 2009;**30**:293–342. doi:10.1210/er.2009-0002
- 15 Chai SC, Cherian MT, Wang Y-M, *et al.* Small-molecule modulators of PXR and CAR. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech* 2016;**1859**:1141–54. doi:10.1016/j.bbagr.2016.02.013
- 16 Mani S, Dou W, Redinbo MR. PXR antagonists and implication in drug metabolism. *Drug Metab Rev* 2013;**45**:60–72. doi:10.3109/03602532.2012.746363
- 17 Delfosse V, Dendele B, Huet T, *et al.* Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nat Commun* 2015;**6**:8089. doi:10.1038/ncomms9089
- 18 Kiyama R, Wada-Kiyama Y. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ Int* 2015;**83**:11–40. doi:10.1016/j.envint.2015.05.012
- 19 Myers John Peterson, Zoeller R. Thomas, vom Saal Frederick S. A Clash of Old and New Scientific Concepts in Toxicity, with Important Implications for Public Health. *Environ Health Perspect* 2009;**117**:1652–5. doi:10.1289/ehp.0900887
- 20 Melnick R, Lucier G, Wolfe M, *et al.* Summary of the National Toxicology Program’s report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environ Health Perspect* 2002;**110**:427–31.
- 21 Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, *et al.* Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr Rev* 2012;**33**:378–455. doi:10.1210/er.2011-1050
- 22 US EPA. Endocrine Disruption Research: Testing for Potential Low-Dose Effects. 2014. <https://www.epa.gov/chemical-research/endocrine-disruption-research-testing-potential-low-dose-effects> (accessed 31 Aug 2020).
- 23 Duffus JH, Nordberg M, Templeton DM. Glossary of terms used in toxicology, 2nd edition (IUPAC Recommendations 2007). *Pure Appl Chem* 2007;**79**:1153–344. doi:10.1351/pac200779071153
- 24 Herbst AL, Scully RE. Adenocarcinoma of the vagina in adolescence. A report of 7 cases including 6 clear-cell carcinomas (so-called mesonephromas). *Cancer* 1970;**25**:745–57. doi:10.1002/1097-0142(197004)25:4<745::AID-CNCR2820250402>3.0.CO;2-2
- 25 Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med* 1971;**284**:878–81. doi:10.1056/NEJM197104222841604
- 26 Tournaire M, Devouche E, Espié M, *et al.* Cancer Risk in Women Exposed to Diethylstilbestrol in Utero. *Therapies* 2015;**70**:433–41. doi:10.2515/therapie/2015030
- 27 Tournaire M, Devouche E, Epelboin S, *et al.* Birth defects in children of men exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *Therapie* 2018;**73**:399–407. doi:10.1016/j.therap.2018.02.007
- 28 Kalfa N, Paris F, Soyer-Gobillard M-O, *et al.* Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. *Fertil Steril* 2011;**95**:2574–7. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.02.047

- 29 Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, *et al.* RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 2006;**441**:469–74. doi:10.1038/nature04674
- 30 Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 2012;**41**:10–3. doi:10.1093/ije/dyr184
- 31 Skinner MK. Endocrine Disruptor Induction of Epigenetic Transgenerational Inheritance of Disease. *Mol Cell Endocrinol* 2014;**398**:4–12. doi:10.1016/j.mce.2014.07.019
- 32 Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 2007;**8**:253–62. doi:10.1038/nrg2045
- 33 Li S, Washburn KA, Moore R, *et al.* Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrogen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus. *Cancer Res* 1997;**57**:4356–9.
- 34 Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci* 2007;**104**:13056–61. doi:10.1073/pnas.0703739104
- 35 Zhou C, Gao L, Flaws JA. Exposure to an Environmentally Relevant Phthalate Mixture Causes Transgenerational Effects on Female Reproduction in Mice. *Endocrinology* 2017;**158**:1739–54. doi:10.1210/en.2017-00100
- 36 Body Burden: The Pollution in Newborns. EWG. <https://www.ewg.org/research/body-burden-pollution-newborns> (accessed 20 Sep 2020).
- 37 Svingen T, Vinggaard AM. The risk of chemical cocktail effects and how to deal with the issue. *J Epidemiol Community Health* 2016;**70**:322–3. doi:10.1136/jech-2015-206268
- 38 Tinwell H, Ashby J. Sensitivity of the immature rat uterotrophic assay to mixtures of estrogens. *Environ Health Perspect* 2004;**112**:575–82.
- 39 Brian JV, Harris CA, Scholze M, *et al.* Evidence of estrogenic mixture effects on the reproductive performance of fish. *Environ Sci Technol* 2007;**41**:337–44. doi:10.1021/es0617439
- 40 Kortenkamp A. Ten Years of Mixing Cocktails: A Review of Combination Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals. *Environ Health Perspect* 2007;**115**:98–105. doi:10.1289/ehp.9357
- 41 Kortenkamp A. Low dose mixture effects of endocrine disruptors and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. *Curr Opin Pharmacol* 2014;**19**:105–11. doi:10.1016/j.coph.2014.08.006
- 42 Orton F, Ermler S, Kugathas S, *et al.* Mixture effects at very low doses with combinations of anti-androgenic pesticides, antioxidants, industrial pollutant and chemicals used in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014;**278**:201–8. doi:10.1016/j.taap.2013.09.008
- 43 Gaudriault P, Mazaud-Guittot S, Lavoué V, *et al.* Endocrine Disruption in Human Fetal Testis Explants by Individual and Combined Exposures to Selected Pharmaceuticals, Pesticides, and Environmental Pollutants. *Environ Health Perspect* 2017;**125**:087004. doi:10.1289/EHP1014
- 44 Thorpe N, Shirmohammadi A. Herbicides and nitrates in groundwater of Maryland and childhood cancers: a geographic information systems approach. *J Environ Sci Health Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2005;**23**:261–78. doi:10.1080/10590500500235001

- 45 Braun JM. Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *Nat Rev Endocrinol* 2017;**13**:161–73. doi:10.1038/nrendo.2016.186
- 46 Troisi J, Mikelson C, Richards S, *et al.* Placental concentrations of bisphenol A and birth weight from births in the Southeastern U.S. *Placenta* 2014;**35**:947–52. doi:10.1016/j.placenta.2014.08.091
- 47 Veiga-Lopez A, Kannan K, Liao C, *et al.* Gender-Specific Effects on Gestational Length and Birth Weight by Early Pregnancy BPA Exposure. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;**100**:E1394-1403. doi:10.1210/jc.2015-1724
- 48 Govarts Eva, Nieuwenhuijsen Mark, Schoeters Greet, *et al.* Birth Weight and Prenatal Exposure to Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE): A Meta-analysis within 12 European Birth Cohorts. *Environ Health Perspect* 2012;**120**:162–70. doi:10.1289/ehp.1103767
- 49 Washino Noriaki, Saijo Yasuaki, Sasaki Seiko, *et al.* Correlations between Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals and Reduced Fetal Growth. *Environ Health Perspect* 2009;**117**:660–7. doi:10.1289/ehp.11681
- 50 Li W, Guo J, Wu C, *et al.* Effects of prenatal exposure to five parabens on neonatal thyroid function and birth weight: Evidence from SMBCS study. *Environ Res* 2020;**188**:109710. doi:10.1016/j.envres.2020.109710
- 51 Jamal A, Rastkari N, Dehghaniathar R, *et al.* Prenatal exposure to parabens and anthropometric birth outcomes: A systematic review. *Environ Res* 2019;**173**:419–31. doi:10.1016/j.envres.2019.02.044
- 52 Tang R, Chen M, Ding G, *et al.* Associations of prenatal exposure to phenols with birth outcomes. *Environ Pollut* 2013;**178**:115–20. doi:10.1016/j.envpol.2013.03.023
- 53 Govarts E, Iszatt N, Trnovec T, *et al.* Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals and risk of being born small for gestational age: Pooled analysis of seven European birth cohorts. *Environ Int* 2018;**115**:267–78. doi:10.1016/j.envint.2018.03.017
- 54 Aker AM, Ferguson KK, Rosario ZY, *et al.* The associations between prenatal exposure to triclocarban, phenols and parabens with gestational age and birth weight in northern Puerto Rico. *Environ Res* 2019;**169**:41–51. doi:10.1016/j.envres.2018.10.030
- 55 Gascon M, Casas M, Morales E, *et al.* Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and childhood respiratory tract infections and allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2015;**135**:370–8. doi:10.1016/j.jaci.2014.09.030
- 56 Zarean M, Keikha M, Feizi A, *et al.* The role of exposure to phthalates in variations of anogenital distance: A systematic review and meta-analysis. *Environ Pollut Barking Essex 1987* 2019;**247**:172–9. doi:10.1016/j.envpol.2019.01.026
- 57 Huang P-C, Kuo P-L, Chou Y-Y, *et al.* Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environ Int* 2009;**35**:14–20. doi:10.1016/j.envint.2008.05.012
- 58 Lassen TH, Frederiksen H, Kyhl HB, *et al.* Prenatal Triclosan Exposure and Anthropometric Measures Including Anogenital Distance in Danish Infants. *Environ Health Perspect* 2016;**124**:1261–8. doi:10.1289/ehp.1409637

- 59 Jiang Y, Zhao H, Xia W, *et al.* Prenatal exposure to benzophenones, parabens and triclosan and neurocognitive development at 2 years. *Environ Int* 2019;**126**:413–21. doi:10.1016/j.envint.2019.01.023
- 60 Lim Y-H, Bae S, Kim B-N, *et al.* Prenatal and postnatal bisphenol A exposure and social impairment in 4-year-old children. *Environ Health Glob Access Sci Source* 2017;**16**:79. doi:10.1186/s12940-017-0289-2
- 61 Miodovnik A, Engel SM, Zhu C, *et al.* Endocrine disruptors and childhood social impairment. *Neurotoxicology* 2011;**32**:261–7. doi:10.1016/j.neuro.2010.12.009
- 62 Ferguson KK, Peterson KE, Lee JM, *et al.* Prenatal and peripubertal phthalates and bisphenol A in relation to sex hormones and puberty in boys. *Reprod Toxicol* 2014;**47**:70–6. doi:10.1016/j.reprotox.2014.06.002
- 63 Michalakis M, Tzatzarakis MN, Kovatsi L, *et al.* Hypospadias in offspring is associated with chronic exposure of parents to organophosphate and organochlorine pesticides. *Toxicol Lett* 2014;**230**:139–45. doi:10.1016/j.toxlet.2013.10.015
- 64 Shafei AE-S, Nabih ES, Shehata KA, *et al.* Prenatal Exposure to Endocrine Disruptors and Reprogramming of Adipogenesis: An Early-Life Risk Factor for Childhood Obesity. *Child Obes Print* 2018;**14**:18–25. doi:10.1089/chi.2017.0180
- 65 Birnbaum LS, Fenton SE. Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ Health Perspect* 2003;**111**:389–94. doi:10.1289/ehp.5686
- 66 Cohn BA, La Merrill M, Krigbaum NY, *et al.* DDT Exposure in Utero and Breast Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;**100**:2865–72. doi:10.1210/jc.2015-1841
- 67 Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007;**261**:412–7. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x
- 68 Hanson M. The birth and future health of DOHaD. *J Dev Orig Health Dis* 2015;**6**:434–7. doi:10.1017/S2040174415001129
- 69 Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, *et al.* Developmental origins of non-communicable disease: Implications for research and public health. *Environ Health Glob Access Sci Source* 2012;**11**:42. doi:10.1186/1476-069X-11-42
- 70 D J Barker C Osmond. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. Published Online First: 1986. doi:10.1016/s0140-6736(86)91340-1
- 71 Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, *et al.* Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ* 1997;**315**:396–400. doi:10.1136/bmj.315.7105.396
- 72 Andersen LG, Ångquist L, Eriksson JG, *et al.* Birth Weight, Childhood Body Mass Index and Risk of Coronary Heart Disease in Adults: Combined Historical Cohort Studies. *PLoS ONE* 2010;**5**:e14126. doi:10.1371/journal.pone.0014126
- 73 Osler M, Lund R, Kriegbaum M, *et al.* The influence of birth weight and body mass in early adulthood on early coronary heart disease risk among Danish men born in 1953. *Eur J Epidemiol* 2009;**24**:57–61. doi:10.1007/s10654-008-9301-z

- 74 Rugholm S, Baker JL, Olsen LW, *et al.* Stability of the Association between Birth Weight and Childhood Overweight during the Development of the Obesity Epidemic. *Obes Res* 2005;**13**:2187–94. doi:10.1038/oby.2005.271
- 75 Philippat C, Nakiwala D, Calafat AM, *et al.* Prenatal Exposure to Nonpersistent Endocrine Disruptors and Behavior in Boys at 3 and 5 Years. *Environ Health Perspect* 2017;**125**:097014. doi:10.1289/EHP1314
- 76 Weinberger B, Vetrano AM, Archer FE, *et al.* Effects of maternal exposure to phthalates and bisphenol A during pregnancy on gestational age. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet* 2014;**27**:323–7. doi:10.3109/14767058.2013.815718
- 77 Ferguson KK, McElrath TF, Meeker JD. Environmental phthalate exposure and preterm birth. *JAMA Pediatr* 2014;**168**:61–7. doi:10.1001/jamapediatrics.2013.3699
- 78 Perturbateurs endocriniens. Effets suspectés sur la santé - Risques - INRS. <http://www.inrs.fr/risques/perturbateurs-endocriniens/effets-sur-la-sante.html> (accessed 20 Sep 2020).
- 79 Elefant E, Vauzelle C, Cournot M-P, *et al.* Médicaments et grossesse. *Médecine Thérapeutique* 2007;**13**:403–10. doi:10.1684/met.2007.0137
- 80 Wood AJJ, Kearns GL, Abdel-Rahman SM, *et al.* Developmental Pharmacology — Drug Disposition, Action, and Therapy in Infants and Children. *N Engl J Med* 2003;**349**:1157–67. doi:10.1056/NEJMra035092
- 81 Stefanidou M, Maravelias C, Spiliopoulou C. Human exposure to endocrine disruptors and breast milk. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009;**9**:269–76. doi:10.2174/187153009789044374
- 82 Grecco CF, Souza ID, Queiroz MEC. Recent development of chromatographic methods to determine parabens in breast milk samples: A review. *J Chromatogr B* 2018;**1093–1094**:82–90. doi:10.1016/j.jchromb.2018.06.059
- 83 Park N-Y, Cho YH, Choi K, *et al.* Parabens in breast milk and possible sources of exposure among lactating women in Korea. *Environ Pollut Barking Essex 1987* 2019;**255**:113142. doi:10.1016/j.envpol.2019.113142
- 84 Kim JH, Kim D, Moon S-M, *et al.* Associations of lifestyle factors with phthalate metabolites, bisphenol A, parabens, and triclosan concentrations in breast milk of Korean mothers. *Chemosphere* 2020;**249**:126149. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126149
- 85 Brucker-Davis F, Wagner-Mahler K, Bornebusch L, *et al.* Exposure to selected endocrine disruptors and neonatal outcome of 86 healthy boys from Nice area (France). *Chemosphere* 2010;**81**:169–76. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.06.068
- 86 Costet N, Pelé F, Comets E, *et al.* Perinatal exposure to chlordecone and infant growth. *Environ Res* 2015;**142**:123–34. doi:10.1016/j.envres.2015.06.023
- 87 Code la Santé Publique - Chapitre 1er : Missions. (Articles L5311-1 à L5311-3) - Légifrance. <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000033897163/2017-07-01/> (accessed 18 Oct 2020).



- 88 Gouyon B, Martin-Mons S, Iacobelli S, *et al.* Characteristics of prescription in 29 Level 3 Neonatal Wards over a 2-year period (2017-2018). An inventory for future research. *PLOS ONE* 2019;**14**:e0222667. doi:10.1371/journal.pone.0222667
- 89 Calafat AM, Weuve J, Ye X, *et al.* Exposure to Bisphenol A and Other Phenols in Neonatal Intensive Care Unit Premature Infants. *Environ Health Perspect* 2009;**117**:639–44. doi:10.1289/ehp.0800265
- 90 Green Ronald, Hauser Russ, Calafat Antonia M., *et al.* Use of Di(2-ethylhexyl) Phthalate–Containing Medical Products and Urinary Levels of Mono(2-ethylhexyl) Phthalate in Neonatal Intensive Care Unit Infants. *Environ Health Perspect* 2005;**113**:1222–5. doi:10.1289/ehp.7932
- 91 Stroustrup A, Bragg JB, Busgang SA, *et al.* Sources of clinically significant neonatal intensive care unit phthalate exposure. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2020;**30**:137–48. doi:10.1038/s41370-018-0069-2
- 92 Latini G, Ferri M, Chiellini F. Materials Degradation in PVC Medical Devices, DEHP Leaching and Neonatal Outcomes. *Curr Med Chem* 2010;**17**:2979–89. doi:10.2174/092986710792064992
- 93 Bouattour Y, Wasiak M, Bernard L, *et al.* Quantification of bis(2-ethylhexyl) phthalate released by medical devices during respiratory assistance and estimation of patient exposure. *Chemosphere* 2020;**255**:126978. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126978
- 94 Nassan FL, Korevaar TIM, Coull BA, *et al.* Dibutyl-phthalate exposure from mesalamine medications and serum thyroid hormones in men. *Int J Hyg Environ Health* 2019;**222**:101–10. doi:10.1016/j.ijheh.2018.08.008
- 95 SCENIHR. Opinion on the safety of medical devices containing DEHP-plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk. 2009.
- 96 Bell EM, Yeung EH, Ma W, *et al.* Concentrations of endocrine disrupting chemicals in newborn blood spots and infant outcomes in the upstate KIDS study. *Environ Int* 2018;**121**:232–9. doi:10.1016/j.envint.2018.09.005
- 97 Duty SM, Mendonca K, Hauser R, *et al.* Potential Sources of Bisphenol A in the Neonatal Intensive Care Unit. *PEDIATRICS* 2013;**131**:483–9. doi:10.1542/peds.2012-1380
- 98 Völkel W, Kiranoglu M, Fromme H. Determination of free and total bisphenol A in urine of infants. *Environ Res* 2011;**111**:143–8. doi:10.1016/j.envres.2010.10.001
- 99 National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals | CDC. 2020. <https://www.cdc.gov/exposurereport/index.html> (accessed 4 Oct 2020).
- 100 Règlement (UE) 2017/745 du Parlement européen et du Conseil du 5 avril 2017 relatif aux dispositifs médicaux, modifiant la directive 2001/83/CE, le règlement (CE) n° 178/2002 et le règlement (CE) n° 1223/2009 et abrogeant les directives du Conseil 90/385/CEE et 93/42/CEE (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. ). 2017. <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/745/oj/fra> (accessed 18 Oct 2020).
- 101 Xue J, Liu W, Kannan K. Bisphenols, Benzophenones, and Bisphenol A Diglycidyl Ethers in Textiles and Infant Clothing. 2017. doi:10.1021/acs.est.7b00701

- 102 Freire C, Molina-Molina J-M, Iribarne-Durán LM, *et al.* Concentrations of bisphenol A and parabens in socks for infants and young children in Spain and their hormone-like activities. *Environ Int* 2019;**127**:592–600. doi:10.1016/j.envint.2019.04.013
- 103 Andaluri G, Manickavachagam M, Suri R. Plastic toys as a source of exposure to bisphenol-A and phthalates at childcare facilities. *Environ Monit Assess* 2018;**190**:65. doi:10.1007/s10661-017-6438-9
- 104 Kirchnawy C, Hager F, Piniella VO, *et al.* Potential endocrine disrupting properties of toys for babies and infants. *PLOS ONE* 2020;**15**:e0231171. doi:10.1371/journal.pone.0231171
- 105 Berger E, Potouridis T, Haeger A, *et al.* Effect-directed identification of endocrine disruptors in plastic baby teethers. *J Appl Toxicol JAT* 2015;**35**:1254–61. doi:10.1002/jat.3159
- 106 Negev M, Berman T, Reicher S, *et al.* Concentrations of trace metals, phthalates, bisphenol A and flame-retardants in toys and other children’s products in Israel. *Chemosphere* 2018;**192**:217–24. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.10.132
- 107 Moya J, Bearer CF, Etzel RA. Children’s Behavior and Physiology and How It Affects Exposure to Environmental Contaminants. *Pediatrics* 2004;**113**:996–1006.
- 108 Fisher M, Arbuckle TE, MacPherson S, *et al.* Phthalate and BPA Exposure in Women and Newborns through Personal Care Product Use and Food Packaging. *Environ Sci Technol* 2019;**53**:10813–26. doi:10.1021/acs.est.9b02372
- 109 Sathyanarayana S, Karr CJ, Lozano P, *et al.* Baby care products: possible sources of infant phthalate exposure. *Pediatrics* 2008;**121**:e260-268. doi:10.1542/peds.2006-3766
- 110 Koniecki D, Wang R, Moody RP, *et al.* Phthalates in cosmetic and personal care products: Concentrations and possible dermal exposure. *Environ Res* 2011;**111**:329–36. doi:10.1016/j.envres.2011.01.013
- 111 Commission Regulation (EU) No 358/2014 of 9 April 2014 amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products Text with EEA relevance. 2014. <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/358/oj/eng> (accessed 6 Oct 2020).
- 112 PubChem. Methylparaben. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7456> (accessed 20 Sep 2020).
- 113 PubChem. Ethylparaben. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 20 Sep 2020).
- 114 PubChem. Propylparaben. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7175> (accessed 20 Sep 2020).
- 115 PubChem. Butylparaben. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7184> (accessed 20 Sep 2020).
- 116 Błędzka D, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Parabens. From environmental studies to human health. *Environ Int* 2014;**67**:27–42. doi:10.1016/j.envint.2014.02.007
- 117 Liao X, Raghavan GSV, Yaylayan VA. A novel way to prepare n-butylparaben under microwave irradiation. *Tetrahedron Lett* 2002;**43**:45–8. doi:10.1016/S0040-4039(01)02065-2

- 118 Soni MG, Carabin IG, Burdock GA. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol* 2005;**43**:985–1015. doi:10.1016/j.fct.2005.01.020
- 119 Aubert N, Ameller T, Legrand J-J. Systemic exposure to parabens: Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food Chem Toxicol* 2012;**50**:445–54. doi:10.1016/j.fct.2011.12.045
- 120 Shin M-Y, Shin C, Choi JW, *et al.* Pharmacokinetic profile of propyl paraben in humans after oral administration. *Environ Int* 2019;**130**:104917. doi:10.1016/j.envint.2019.104917
- 121 Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol* 2008;**28**:561–78. doi:10.1002/jat.1358
- 122 Matwiejczuk N, Galicka A, Brzóška MM. Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens. *J Appl Toxicol* 2020;**40**:176–210. doi:10.1002/jat.3917
- 123 Ishiwatari S, Suzuki T, Hitomi T, *et al.* Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *J Appl Toxicol JAT* 2007;**27**:1–9. doi:10.1002/jat.1176
- 124 Janjua NR, Mortensen GK, Andersson A-M, *et al.* Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. *Environ Sci Technol* 2007;**41**:5564–70. doi:10.1021/es0628755
- 125 Lakeram M, Lockley DJ, Sanders DJ, *et al.* Paraben transport and metabolism in the biomimetic artificial membrane permeability assay (BAMPA) and 3-day and 21-day Caco-2 cell systems. *J Biomol Screen* 2007;**12**:84–91. doi:10.1177/1087057106295383
- 126 Oh SY, Fujii M, Takeda Y, *et al.* The effect of ethanol on the simultaneous transport and metabolism of methyl p-hydroxybenzoate in excised skin of Yucatan micropig. *Int J Pharm* 2002;**236**:35–42. doi:10.1016/s0378-5173(02)00005-4
- 127 Abbas S, Aél H, Greige-Gerges À, *et al.* Metabolism of Parabens (4-Hydroxybenzoic Acid Esters) by Hepatic Esterases and UDP-Glucuronosyltransferases in Man. *Drug Metab Pharmacokinet* 2010;**25**:568–77.
- 128 Moos RK, Angerer J, Dierkes G, *et al.* Metabolism and elimination of methyl, iso- and n-butyl paraben in human urine after single oral dosage. *Arch Toxicol* 2016;**90**:2699–709. doi:10.1007/s00204-015-1636-0
- 129 Gerona R, Saal FS vom, Hunt PA. BPA: have flawed analytical techniques compromised risk assessments? *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020;**8**:11–3. doi:10.1016/S2213-8587(19)30381-X
- 130 Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, *et al.* ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERalpha and PR. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 2001;**39**:1225–32. doi:10.1016/s0278-6915(01)00073-4
- 131 Byford JR, Shaw LE, Drew MGB, *et al.* Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;**80**:49–60. doi:10.1016/s0960-0760(01)00174-1

- 132 Routledge EJ, Parker J, Odum J, *et al.* Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;**153**:12–9. doi:10.1006/taap.1998.8544
- 133 Vo TTB, Yoo Y-M, Choi K-C, *et al.* Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. *Reprod Toxicol Elmsford N* 2010;**29**:306–16. doi:10.1016/j.reprotox.2010.01.013
- 134 Oishi S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol* 2002;**40**:1807–13. doi:10.1016/S0278-6915(02)00204-1
- 135 Boberg J, Axelstad M, Svingen T, *et al.* Multiple Endocrine Disrupting Effects in Rats Perinatally Exposed to Butylparaben. *Toxicol Sci* 2016;**152**:244–56. doi:10.1093/toxsci/kfw079
- 136 Zhang L, Dong L, Ding S, *et al.* Effects of n-butylparaben on steroidogenesis and spermatogenesis through changed E2 levels in male rat offspring. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014;**37**:705–17. doi:10.1016/j.etap.2014.01.016
- 137 Vo TTB, Jung E-M, Choi K-C, *et al.* Estrogen receptor  $\alpha$  is involved in the induction of Calbindin-D9k and progesterone receptor by parabens in GH3 cells: A biomarker gene for screening xenoestrogens. *Steroids* 2011;**76**:675–81. doi:10.1016/j.steroids.2011.03.006
- 138 Nowak K, Ratajczak-Wrona W, Górska M, *et al.* Parabens and their effects on the endocrine system. *Mol Cell Endocrinol* 2018;**474**:238–51. doi:10.1016/j.mce.2018.03.014
- 139 Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, *et al.* Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol* 2004;**24**:5–13. doi:10.1002/jat.958
- 140 Harley KG, Berger KP, Kogut K, *et al.* Association of phthalates, parabens and phenols found in personal care products with pubertal timing in girls and boys. *Hum Reprod* 2019;**34**:109–17. doi:10.1093/humrep/dey337
- 141 Charnock C, Finsrud T. Combining esters of para-hydroxy benzoic acid (parabens) to achieve increased antimicrobial activity. *J Clin Pharm Ther* 2007;**32**:567–72. doi:10.1111/j.1365-2710.2007.00854.x
- 142 Soni MG, Taylor SL, Greenberg NA, *et al.* Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem Toxicol* 2002;**40**:1335–73. doi:10.1016/S0278-6915(02)00107-2
- 143 INERIS. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Parabènes, DRC-15-136881-10349A. 2015.
- 144 Kang Y-H, Parker CC, Smith AC, *et al.* Characterization and distribution of phenolics in carrot cell walls. *J Agric Food Chem* 2008;**56**:8558–64. doi:10.1021/jf801540k
- 145 Sellappan S, Akoh CC, Krewer G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. *J Agric Food Chem* 2002;**50**:2432–8. doi:10.1021/jf011097r
- 146 Huang W, Zhang H, Liu W, *et al.* Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012;**13**:94–102. doi:10.1631/jzus.B1100137

- 147 Règlement (UE) n o 1129/2011 de la Commission du 11 novembre 2011 modifiant l'annexe II du règlement (CE) n o 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil en vue d'y inclure une liste de l'Union des additifs alimentaires Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. 2011. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1129/oj/eng> (accessed 6 Oct 2020).
- 148 Directive 2006/52/CE du Parlement européen et du Conseil du 5 juillet 2006 modifiant la directive 95/2/CE concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants et la directive 94/35/CE concernant les édulcorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires. 2006. <http://data.europa.eu/eli/dir/2006/52/oj/eng> (accessed 6 Oct 2020).
- 149 EFSA advises on the safety of paraben usage in food. Eur. Food Saf. Auth. 2004. <https://www.efsa.europa.eu/en/news/efsa-advises-safety-paraben-usage-food> (accessed 6 Oct 2020).
- 150 Electronic Code of Federal Regulations (eCFR). Electron. Code Fed. Regul. ECFR. <https://www.ecfr.gov/> (accessed 6 Oct 2020).
- 151 Guo Y, Kannan K. A Survey of Phthalates and Parabens in Personal Care Products from the United States and Its Implications for Human Exposure. *Environ Sci Technol* 2013;**47**:14442–9. doi:10.1021/es4042034
- 152 Règlement (CE) no 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques.
- 153 Médicaments et Parabènes - Point d'information - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Actualisé le 25/05/2011. ANSM <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Medicaments-et-Parabenes-Point-d-information> (accessed 24 Apr 2017).
- 154 European Medicines Agency. Reflection paper on the use of methyl- and propylparaben as excipients in human medicinal products for oral use. 2013.
- 155 Académie Nationale de Pharmacie. Parabènes et médicaments : un problème de santé publique ? Recommandations adoptées suite à la séance du 6 mars 2013 par le Conseil du 22 mai 2013. 2013.
- 156 Moreta C, Tena M-T, Kannan K. Analytical method for the determination and a survey of parabens and their derivatives in pharmaceuticals. *Environ Res* 2015;**142**:452–60. doi:10.1016/j.envres.2015.07.014
- 157 Ma W-L, Zhao X, Lin Z-Y, *et al.* A survey of parabens in commercial pharmaceuticals from China and its implications for human exposure. *Environ Int* 2016;**95**:30–5. doi:10.1016/j.envint.2016.07.013
- 158 Lass J, Naelapää K, Shah U, *et al.* Hospitalised neonates in Estonia commonly receive potentially harmful excipients. *BMC Pediatr* 2012;**12**. doi:10.1186/1471-2431-12-136
- 159 Souza A, Santos D, Fonseca S, *et al.* Toxic excipients in medications for neonates in Brazil. *Eur J Pediatr* 2014;**173**:935–45. doi:10.1007/s00431-014-2272-z
- 160 Garcia-Palop B, Movilla Polanco E, Cañete Ramirez C, *et al.* Harmful excipients in medicines for neonates in Spain. *Int J Clin Pharm* 2016;**38**:238–42. doi:10.1007/s11096-016-0277-6

- 161 Nellis G, Metsvaht T, Varendi H, *et al.* Potentially harmful excipients in neonatal medicines: A pan-European observational study. *Arch Dis Child* 2015;**100**:694–9. doi:10.1136/archdischild-2014-307793
- 162 Mulla H, Yakkundi S, McElnay J, *et al.* An observational study of blood concentrations and kinetics of methyl- and propyl-parabens in neonates. *Pharm Res* 2015;**32**:1084–93. doi:10.1007/s11095-014-1520-2
- 163 Frederiksen H, Jørgensen N, Andersson A-M. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2011;**21**:262–71. doi:10.1038/jes.2010.6
- 164 Pycke BFG, Geer LA, Dalloul M, *et al.* Maternal and fetal exposure to parabens in a multiethnic urban U.S. population. *Environ Int* 2015;**84**:193–200. doi:10.1016/j.envint.2015.08.012
- 165 WHO. Global status report on noncommunicable diseases. 2010.
- 166 Commission Regulation (EU) 2018/605 of 19 April 2018 amending Annex II to Regulation (EC) No 1107/2009 by setting out scientific criteria for the determination of endocrine disrupting properties (Text with EEA relevance. ). 2018. <http://data.europa.eu/eli/reg/2018/605/oj/eng> (accessed 11 Dec 2019).
- 167 Kortenkamp A, Martin O, Faust M, *et al.* State of the art assessment of endocrine disrupters. 2011.
- 168 European Environment Agency. *The impacts of endocrine disrupters on wildlife, people and their environments – The Weybridge+15 (1996–2011) report*. 2012. doi:10.2800/41462 ISSN 1725-2237 ISBN 978-92-9213-307-8
- 169 WHO. Endocrine disrupters and child health. Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health. Published Online First: 2012. [http://www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html) (accessed 24 Apr 2017).
- 170 Skakkebaek NE, Toppari J, Söder O, *et al.* The exposure of fetuses and children to endocrine disrupting chemicals: A European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) and Pediatric Endocrine Society (PES) call to action statement. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011. 3056–8. doi:10.1210/jc.2011-1269
- 171 Giulivo M, Lopez de Alda M, Capri E, *et al.* Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environ Res* 2016;**151**:251–64. doi:10.1016/j.envres.2016.07.011
- 172 Rapport au Parlement relatif aux perturbateurs endocriniens. 2014.
- 173 Hindmarsh KW, John E, Asali LA, *et al.* Urinary Excretion of Methylparaben and Its Metabolites in Preterm Infants. *J Pharm Sci* 1983;**72**:1039–41. doi:10.1002/jps.2600720919
- 174 Sautou V, Brossard D, Crauste-Manciet S, *et al.* *Guide méthodologique des études de stabilité des préparations*. 2013.

- 175 European Pharmacopoeia 9.2. 5.1.4. Microbiological quality of non-sterile products for pharmaceutical use. 2017;**2**:507.
- 176 Binson G, Beuzit K, Migeot V, *et al.* Preparation and Physicochemical Stability of Liquid Oral Dosage Forms Free of Potentially Harmful Excipient Designed for Pediatric Patients. *Pharmaceutics* 2019;**11**:190. doi:10.3390/pharmaceutics11040190
- 177 Règlement (UE) n °1004/2014 de la Commission du 18 septembre 2014 modifiant l'annexe V du règlement (CE) n ° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. 2014. <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/1004/oj/fra> (accessed 9 Dec 2019).
- 178 Code de la santé publique - Article L5131-1.
- 179 Scientific Committee on Consumer Products (SCCP). Extended opinion on the safety evaluation of parabens.
- 180 Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, *et al.* Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxicol* 2010;**30**:301–12. doi:10.1016/j.reprotox.2010.03.011
- 181 Cowan-Ellsberry CE, Robison SH. Refining Aggregate Exposure: Example using Parabens. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009;**55**:321–9. doi:10.1016/j.yrtph.2009.08.004
- 182 Cariot A. *Parabènes dans les médicaments et néonatalogie. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie et mémoire du diplôme d'études spécialisés de pharmacie*. 2013.
- 183 Prématurité. Inserm - Sci. Pour Santé. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/prematurite> (accessed 16 Sep 2020).
- 184 Naissances et taux de natalité | Insee. <https://www.insee.fr/fr/statistiques/2381380#tableau-figure1> (accessed 15 Oct 2020).
- 185 Iribarne-Durán LM, Artacho-Cordón F, Peña-Caballero M, *et al.* Presence of Bisphenol A and Parabens in a Neonatal Intensive Care Unit: An Exploratory Study of Potential Sources of Exposure. *Environ Health Perspect* 2019;**127**:117004. doi:10.1289/EHP5564
- 186 Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, *et al.* Urinary Concentrations of Four Parabens in the U.S. Population: NHANES 2005–2006. *Environ Health Perspect* 2010;**118**:679–85. doi:10.1289/ehp.0901560
- 187 Ye X, Bishop AM, Reidy JA, *et al.* Parabens as Urinary Biomarkers of Exposure in Humans. *Environ Health Perspect* 2006;**114**:1843–6. doi:10.1289/ehp.9413
- 188 Herreros Fernández ML, González Merino N, Tagarro García A, *et al.* A new technique for fast and safe collection of urine in newborns. *Arch Dis Child* 2013;**98**:27–9. doi:10.1136/archdischild-2012-301872
- 189 Yakkundi S, Mulla H, Pandya H, *et al.* Quantitative analysis of methyl and propyl parabens in neonatal DBS using LC-MS/MS. *Bioanalysis* 2016;**8**:1173–82. doi:10.4155/bio-2016-0029
- 190 Rouillon S. Outils d'évaluation d'une intervention d'éducation pour la santé environnementale périnatale. *Gay Lussac* 2016;:344.

- 191 EMA. Guideline on bioanalytical method validation. *EMEA Comm Med Prod Hum Use* 2012;**44**:1–23. doi:EMEA/CHMP/EWP/192217/2009
- 192 FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. 2018. 44.
- 193 Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. *Anal Chem* 2003;**75**:3019–30. doi:10.1021/ac020361s
- 194 Kolatorova Sosvorova L, Chlupacova T, Vitku J, *et al.* Determination of selected bisphenols, parabens and estrogens in human plasma using LC-MS/MS. *Talanta* 2017;**174**:21–8. doi:10.1016/j.talanta.2017.05.070
- 195 Shekhar S, Sood S, Showkat S, *et al.* Detection of phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) from maternal blood plasma and amniotic fluid in Indian population. *Gen Comp Endocrinol* 2017;**241**:100–7. doi:10.1016/j.ygcen.2016.05.025
- 196 Ye X, Tao LJ, Needham LL, *et al.* Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method for measuring environmental phenols and parabens in serum. *Talanta* 2008;**76**:865–71. doi:10.1016/j.talanta.2008.04.034
- 197 Geer LA, Pycke BFG, Waxenbaum J, *et al.* Association of birth outcomes with fetal exposure to parabens, triclosan and triclocarban in an immigrant population in Brooklyn, New York. *J Hazard Mater* 2017;**323**:177–83. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.03.028
- 198 Shen X, Liang J, Zheng L, *et al.* Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the preconcentration of eight parabens in real samples and their determination by high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci* 2017;**40**:4385–93. doi:10.1002/jssc.201700722
- 199 Sandanger TM, Huber S, Moe MK, *et al.* Plasma concentrations of parabens in postmenopausal women and self-reported use of personal care products: the NOWAC postgenome study. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2011;**21**:595–600. doi:10.1038/jes.2011.22
- 200 Vela-Soria F, Ballesteros O, Rodríguez I, *et al.* A new treatment by dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of parabens in human serum samples. *Anal Bioanal Chem* 2013;**405**:7259–67. doi:10.1007/s00216-013-7181-x
- 201 Hines EP, Mendola P, vonEhrenstein OS, *et al.* Concentrations of Environmental Phenols and Parabens in Milk, Urine and Serum of Lactating North Carolina Women. *Reprod Toxicol Elmsford N* 2015;**54**:120–8. doi:10.1016/j.reprotox.2014.11.006
- 202 Vela-Soria F, Ballesteros O, Zafra-Gómez A, *et al.* UHPLC-MS/MS method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives, bisphenol S, parabens, and benzophenones in human urine samples. *Anal Bioanal Chem* 2014;**406**:3773–85. doi:10.1007/s00216-014-7785-9
- 203 Thakare R, Chhonker YS, Gautam N, *et al.* Quantitative analysis of endogenous compounds. *J Pharm Biomed Anal* 2016;**128**:426–37. doi:10.1016/j.jpba.2016.06.017
- 204 van de Merbel NC. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. *TrAC Trends Anal Chem* 2008;**27**:924–33. doi:10.1016/j.trac.2008.09.002



- 205 Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;**45**:1121–32. doi:10.1016/j.biocel.2013.02.019
- 206 Lapillonne A, Becquet O. Recommandations pour les apports en fer pendant les six premiers mois de vie. *Arch Pédiatrie* 2017;**24**:5S40–4. doi:10.1016/S0929-693X(17)24008-1
- 207 Valeri BO, Holsti L, Linhares MBM. Neonatal pain and developmental outcomes in children born preterm: a systematic review. *Clin J Pain* 2015;**31**:355–62. doi:10.1097/AJP.000000000000114
- 208 Mesek I, Nellis G, Lass J, *et al.* Medicines prescription patterns in European neonatal units. *Int J Clin Pharm* 2019;**41**:1578–91. doi:10.1007/s11096-019-00923-2
- 209 Rosli R, Dali AF, Abd Aziz N, *et al.* Drug Utilization on Neonatal Wards: A Systematic Review of Observational Studies. *Front Pharmacol* 2017;**8**. doi:10.3389/fphar.2017.00027
- 210 ANSM. Pharmacopée française - Julep Gommeux - Monographie.
- 211 Blanc A, Bonnet F, Brun-Vezinet F, *et al.* Groupe d'experts pour la prise en charge du VIH. 2018;;52.
- 212 Montamat S. Antibiothérapie en néonatalogie. *T HÉRAPEUTIQUE* 1999;;4.
- 213 Suyagh M, Collier PS, Millership JS, *et al.* Metronidazole Population Pharmacokinetics in Preterm Neonates Using Dried Blood-Spot Sampling. *Pediatrics* 2011;**127**:e367–74. doi:10.1542/peds.2010-0807
- 214 Stability of Metronidazole Benzoate in SyrSpend SF One-Step Suspension System. IJPC. <https://ijpc.com/Abstracts/Abstract.cfm?ABS=2874> (accessed 20 Oct 2020).
- 215 Guerrier K, Shamszad P, Czosek RJ, *et al.* Variation in Antiarrhythmic Management of Infants Hospitalized with Supraventricular Tachycardia: A Multi-Institutional Analysis. *Pediatr Cardiol* 2016;**37**:946–52. doi:10.1007/s00246-016-1375-x
- 216 Smith PB, Cotten CM, Hudak ML, *et al.* Rifampin Pharmacokinetics and Safety in Preterm and Term Infants. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;**63**. doi:10.1128/AAC.00284-19
- 217 Doare KL, Barber N, Doerholt K, *et al.* Rifampicin pharmacokinetics in extreme prematurity to treat congenital tuberculosis. *Case Rep* 2013;**2013**:bcr2012008207. doi:10.1136/bcr-2012-008207
- 218 Thyagarajan B, Deshpande SS. Cotrimoxazole and neonatal kernicterus: a review. *Drug Chem Toxicol* 2014;**37**:121–9. doi:10.3109/01480545.2013.834349
- 219 Nahata MC. Lack of pediatric drug formulations. *Pediatrics* 1999;**104**:607–9.
- 220 Mistry P, Batchelor H. Evidence of acceptability of oral paediatric medicines: a review. *J Pharm Pharmacol* 2017;**69**:361–76. doi:10.1111/jphp.12610
- 221 Conroy S, Choonara I, Impicciatore P, *et al.* Survey of unlicensed and off label drug use in paediatric wards in European countries. *Br Med J* 2000;**320**:79–82.

- 222 EMEA. Reflection paper: formulations of choice for the paediatric population agreed by paediatric working party & quality working party adoption by CHMP for release for consultation. 2006.
- 223 Richey RH, Shah UU, Peak M, *et al.* Manipulation of drugs to achieve the required dose is intrinsic to paediatric practice but is not supported by guidelines or evidence. *BMC Pediatr* 2013;**13**. doi:10.1186/1471-2431-13-81
- 224 Donovan MD, Griffin BT, Kharoshankaya L, *et al.* Pharmacotherapy for Neonatal Seizures: Current Knowledge and Future Perspectives. *Drugs* 2016;**76**:647–61. doi:10.1007/s40265-016-0554-7
- 225 Mitchell CD, Richards SM, Kinsey SE, *et al.* Benefit of dexamethasone compared with prednisolone for childhood acute lymphoblastic leukaemia: Results of the UK Medical Research Council ALL97 randomized trial. *Br J Haematol* 2005;**129**:734–45. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05509.x
- 226 Segar JL. Neonatal Diuretic Therapy: Furosemide, Thiazides, and Spironolactone. *Clin Perinatol* 2012;**39**:209–20. doi:10.1016/j.clp.2011.12.007
- 227 Allen LV, Erickson MA. Stability of ketoconazole, metolazone, metronidazole, procainamide hydrochloride, and spironolactone in extemporaneously compounded oral liquids. *Am J Health Syst Pharm* 1996;**53**:2073–8.
- 228 Binson G, Venisse N, Bacle A, *et al.* Preparation and Physico-Chemical Stability of Dexamethasone Oral Suspension. *Pharm Technol Hosp Pharm* 2017;**2**:193. doi:10.1515/ptph-2017-0029
- 229 Ferreira AO, Polonini HC, Silva SL, *et al.* Feasibility of amlodipine besylate, chloroquine phosphate, dapsone, phenytoin, pyridoxine hydrochloride, sulfadiazine, sulfasalazine, tetracycline hydrochloride, trimethoprim and zonisamide in SyrSpend®SF PH4 oral suspensions. *J Pharm Biomed Anal* 2016;**118**:105–12. doi:10.1016/j.jpba.2015.10.032
- 230 Glass BD, Haywood A. Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products. *J Pharm Pharm Sci* 2006;**9**:398–426. doi:10.1016/j.envpol.2006.02.021
- 231 Mendes C, Costa AP, Oliveira PR, *et al.* Physicochemical and microbiological stability studies of extemporaneous antihypertensive pediatric suspensions for hospital use. *Pharm Dev Technol* 2013;**18**:813–20. doi:10.3109/10837450.2012.693504
- 232 Polonini HC, Loures S, Lima LC, *et al.* Stability of Atenolol, Clonazepam, Dexamethasone, Diclofenac Sodium, Diltiazem, Enalapril Maleate, Ketoprofen, Lamotrigine, Penicillamine-D, and Thiamine in SyrSpend SF PH4 Oral Suspensions. *Int J Pharm Compd* 2016;**20**:167–74.
- 233 Polonini HC, Silva SL, De Almeida TR, *et al.* Compatibility of caffeine, carvedilol, clomipramine hydrochloride, folic acid, hydrochlorothiazide, loperamide hydrochloride, methotrexate, nadolol, naltrexone hydrochloride and pentoxifylline in SyrSpend SF PH4 oral suspensions. *Eur J Hosp Pharm* 2016;**23**:352–8. doi:10.1136/ejhpharm-2016-000903
- 234 Fabiano V, Mameli C, Zuccotti GV. Paediatric pharmacology: Remember the excipients. *Pharmacol Res* 2011;**63**:362–5. doi:10.1016/j.phrs.2011.01.006

- 235 Golightly LK, Smolinske SS, Bennett ML, *et al.* Pharmaceutical Excipients. *Med Toxicol* 1988;**3**:209–40. doi:10.1007/BF03259883
- 236 European Medicines Agency. Questions and answers on benzoic acid and benzoates used as excipients in medicinal products for human use. 2017.
- 237 Korotkova EI, Avramchik OA, Angelov TM, *et al.* Investigation of antioxidant activity and lipophilicity parameters of some preservatives. *Electrochimica Acta* 2005;**51**:324–32. doi:10.1016/j.electacta.2005.04.031
- 238 Yalkowsky SH, He Y, Jain P. *Handbook of Aqueous Solubility Data*. 2010.
- 239 Roulet L, Maillard N, Dupuis A. Bonnes pratiques de préparations : le projet de l’Afsaps. *Actual Pharm Hosp* 2007;**3**:39–43. doi:10.1016/S1769-7344(07)70013-6
- 240 Allen LV, Bassani GS, Elder EJ, *et al.* Strength and Stability Testing for Compounded Preparations. *US Pharmacop* 2014;:1–7.
- 241 Abraham J. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In: Brouder A, Tietje C, eds. *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*. Brill 2009. 1041–54. doi:10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897
- 242 ICH. Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1). *Int Conf Harmon Technical Requir Regist Pharm Hum Use* Published Online First: 2005. doi:http://www.ich.org/fileadmin/Public\_Web\_Site/ICH\_Products/Guidelines/Quality/Q2\_R1/Step4/Q2\_R1\_\_Guideline.pdf
- 243 Larsen EC, Devidas M, Chen S, *et al.* Dexamethasone and high-dose methotrexate improve outcome for children and young adults with high-risk B-acute lymphoblastic leukemia: A report from children’s oncology group study AALL0232. *J Clin Oncol* 2016;**34**:2380–8. doi:10.1200/JCO.2015.62.4544
- 244 Mutz AE, Obladen MW. Hyperosmolar oral medication and necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 1985;**75**:371–2.
- 245 SyrSpend® SF PH4 dry | Fagron. <https://fagron.com/en/product/syrspendr-sf-ph4-dry> (accessed 21 Jan 2019).
- 246 European Medicines Agency. Guideline on the investigation of medicinal products in the term and preterm neonate. Published Online First: 2009. <http://www.emea.europa.eu> (accessed 22 Jan 2019).
- 247 Warner A. Drug use in the neonate: interrelationships of pharmacokinetics, toxicity, and biochemical maturity. *Clin Chem* 1986;**32**:721–7.
- 248 Nellis G, Metsvaht T, Varendi H, *et al.* Product Substitution as a Way Forward in Avoiding Potentially Harmful Excipients in Neonates. *Pediatr Drugs* 2016;**18**:221–30. doi:10.1007/s40272-016-0173-5
- 249 Karpuzoglu E, Holladay SD, Gogal RM. Parabens: Potential impact of Low-Affinity Estrogen receptor Binding chemicals on Human health. *J Toxicol Environ Health - Part B Crit Rev* 2013;**16**:321–35. doi:10.1080/10937404.2013.809252

**ANNEXE 1 : EXPOSITION DES NOUVEAU-NES AUX PARABENES VIA LES  
MEDICAMENTS ADMINISTRES DURANT LEUR HOSPITALISATION**



Disponible en ligne sur  
**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
www.em-consulte.com



ARTICLE ORIGINAL

## Exposition des nouveau-nés aux parabènes via les médicaments administrés durant leur hospitalisation



*Neonates exposure to parabens through medicines administered to inpatients*

G. Binson<sup>a,b,\*</sup>, A. Cariot<sup>a,b</sup>, N. Venisse<sup>a</sup>, M. Di Maio<sup>c</sup>,  
S. Rabouan<sup>a,b</sup>, K. Beuzit<sup>b</sup>, A. Dupuis<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Centre d'investigation clinique CIC Inserm 1402, Axe HEDEX (Health-Endocrine Disruptors-EXposome), 6, rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France

<sup>b</sup> Service pharmacie, faculté de médecine et de pharmacie, université de Poitiers, centre hospitalier universitaire de Poitiers, 6, rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France

<sup>c</sup> Pédiatrie, réanimation et néonatalogie, centre hospitalier universitaire de Nîmes, 4, rue du Professeur-Robert-Debré, 30029 Nîmes, France

Reçu le 19 août 2019 ; accepté le 13 janvier 2020  
Disponible sur Internet le 23 janvier 2020

### HIGHLIGHTS

- Plus de 300 médicaments contiennent des parabènes.
- Les médicaments sont une source d'exposition aux parabènes chez les nouveau-nés.
- Tous les nouveau-nés sont exposés au méthyl et au propylparabène.

### MOTS CLÉS

Nouveau-nés ;  
Parabènes ;  
Perturbateur  
endocriniens ;  
Médicaments ;  
Exposition

### Résumé

**Objectifs.** – L'objectif de cette étude a été de quantifier l'apport en parabènes dû à l'administration des médicaments chez les nouveau-nés durant l'hospitalisation qui fait suite à leur naissance.

**Méthodes.** – Une étude monocentrique prospective a été réalisée dans un service de néonatalogie afin de recueillir l'ensemble des prescriptions. Une liste exhaustive des médicaments contenant des parabènes commercialisés en France a été répertoriée à partir de la base de données Thériaque. Cette liste a été croisée avec les prescriptions recueillies afin d'établir un profil d'exposition aux parabènes. Pour chaque médicament prescrit contenant des parabènes, un dosage par HPLC-UV a été réalisée afin de déterminer la dose journalière de parabènes moyenne reçue par les nouveau-nés hospitalisés.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [guillaume.binson@univ-poitiers.fr](mailto:guillaume.binson@univ-poitiers.fr) (G. Binson).

**Résultats.** – Plus de 300 spécialités commercialisées en France contiennent au moins un parabène. Dans la majorité des cas, les médicaments contiennent une association de méthylparabène et de propylparabène. Tous les nouveau-nés hospitalisés ( $n=22$ ) ont été exposés au moins une fois au méthylparabène et au propylparabène via les médicaments tandis que 50 % ont été exposés au propylparabène. La dose journalière moyenne reçue était plus importante chez les nouveau-nés à terme ( $572,0 \pm 249,0$  versus  $414,6 \pm 294,1$   $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$  pour le méthylparabène) mais la fréquence d'exposition étaient plus importantes chez les nouveau-nés prématurés (65,0 versus 78,6 % pour le méthylparabène) ainsi que les doses cumulées ( $1421,5 \pm 758,8$  versus  $8618,7 \pm 7922,3$ ). Ces doses sont inférieures aux valeurs toxicologiques de référence mais ces dernières ne prennent pas en compte l'effet perturbateur endocrinien de ces composés.

**Conclusions.** – Ces résultats démontrent que les médicaments sont une source importante d'exposition aux parabènes chez les nouveau-nés hospitalisés après leur naissance. Ces résultats doivent inciter les industriels et les professionnels de santé à privilégier des prises en charge thérapeutiques sans parabènes.

© 2020 Académie Nationale de Pharmacie. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

#### KEYWORDS

Neonates;  
Parabens;  
Endocrine disruptors;  
Drugs;  
Exposure

#### Summary

**Objectives.** – The objective of this study was to quantify parabens intake due to drug administration in neonates during hospitalization following their birth.

**Method.** – A monocentric prospective study was performed into a neonatology unit to collect all drug prescriptions. An exhaustive list of parabens containing medicines commercialized in France was completed from Theriaque® database. This list was combined with drug prescription to establish an exposure profile to parabens. For each paraben containing medicines, a HPLC-UV assay was performed to determine the average daily intake of paraben received by hospitalized neonates.

**Results.** – More than 300 medicines commercialized in France contain at least one paraben. A combination of methylparaben and propylparaben was found in most cases. All hospitalized neonates ( $n=22$ ) were exposed at least once to methylparaben and propylparaben through medicines while 50 % were exposed to ethylparaben. The average daily intake was higher in term newborns ( $572,0 \pm 249,0$  versus  $414,6 \pm 294,1$   $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$  for methylparaben) but frequency was higher in prematures (65,0 versus 78,6% for methylparaben) as well as cumutives doses ( $1421,5 \pm 758,8$  versus  $8618,7 \pm 7922,3$ ). These doses are lower than toxicological reference values but these latter do not take into account endocrine disrupting effects of these compounds.

**Conclusions.** – These results highlight medicines as a high source of exposure to parabens in hospitalized neonates. It should encourage pharmaceutical companies and health professional to prioritize therapeutic cares without parabens.

© 2020 Académie Nationale de Pharmacie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## Introduction

Ces dernières années, l'incidence des maladies chroniques et notamment des pathologies endocriniennes a progressé de façon importante en France comme au niveau mondial. L'OMS parle même d'une épidémie mondiale [1]. Une des hypothèses avancées se fonde sur l'origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD) selon laquelle la période prénatale et les premières années de vie sont des phases critiques où s'établit une susceptibilité à diverses pathologies chroniques [2,3]. D'après ce concept, le développement précoce du fœtus et de l'enfant (in utero et durant les premières années de la vie postnatale) serait

particulièrement sensible à l'impact des facteurs nutritionnels et environnementaux (chimiques, infectieux) avec des conséquences déterminantes sur l'apparition ultérieure de pathologies (développement de cancers, obésité, maladies métaboliques...) [4].

Parmi les facteurs environnementaux, les perturbateurs endocriniens (PE) sont de plus en plus suspectés. Les PE sont définis comme des substances ou mélanges de substances, qui altèrent les fonctions du système endocrinien et de ce fait induisent des effets néfastes dans un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de (sous)-populations [5,6]. De nombreux travaux ont permis d'améliorer les connaissances de l'impact des PE sur la santé humaine. L'Endocrine

Society, la Commission Européenne ou encore l'Agence Européenne de l'Environnement, concluent toutes que les PE ont des effets néfastes sur l'appareil reproducteur (infertilité, malformations, cancers) [7–9]. Des liens ont été montrés entre l'exposition du fœtus aux PE et la mauvaise qualité du sperme [10]. Sur la base de ces éléments, ces sociétés savantes mettent en avant le besoin de statuer sur un consensus appelant à agir [11].

Les PE sont retrouvés dans de nombreuses familles chimiques, que ce soient des molécules naturelles (hormones, nitrates) ou de synthèse (pesticides, résidus médicamenteux, conservateurs, plastifiants). Parmi ces familles est retrouvée celle des parabènes. Cette famille de molécules, largement utilisées depuis près d'un siècle dans les aliments, les cosmétiques et les médicaments, regroupe les esters de l'acide parahydroxybenzoïque. Le méthylparabène, l'éthylparabène, le propylparabène et le butylparabène sont les composés les plus fréquemment retrouvés. Ces molécules sont suspectées d'être à l'origine d'effet sur la santé humaine. Ainsi, plusieurs études ont démontré le lien entre l'exposition aux parabènes et des effets perturbateurs endocriniens chez l'homme, avec notamment des effets sur les concentrations en hormones sexuelles, en hormones thyroïdiennes ou encore sur le développement de cancers [12–16]. Récemment, il a également été démontré un lien entre l'exposition aux parabènes et une accélération de la puberté chez les garçons [17]. Face à ces données, les autorités sanitaires nationales et internationales recommandent d'en limiter leur utilisation. Ainsi, l'Union Européenne a prévu d'en restreindre l'utilisation chez l'enfant de moins de 3 ans (propyl- et butylparabène) voire d'en interdire complètement l'utilisation (isopropyl-, isobutyl-, phényl-, benzyl- et pentylparabène) [18]. De la même façon, une tentative d'inscrire l'interdiction complète de ces produits dans la loi française a été lancée en 2011. L'European Medicine Agency (EMA) a, quant à elle, entamé une série de réflexions sur l'utilisation du méthyl et du propylparabène dans les médicaments utilisés par voie orale [19]. A l'heure actuelle, l'EMA considère que les preuves cliniques concernant les effets des parabènes sont insuffisantes, tout en soulignant le risque plus grand pour la population pédiatrique. L'EMA recommande que l'utilisation de parabènes comme conservateurs dans un médicament nécessite une justification toute particulière et que l'utilisation de ces substances soit évitée, en particulier en cas de formulation pédiatrique. Enfin, la concentration utilisée doit être la plus basse possible. De même, en l'absence de consensus sur les effets des parabènes sur la santé, l'Académie Nationale de Pharmacie a émis des recommandations notamment pour limiter l'utilisation des parabènes dans les médicaments destinés aux jeunes enfants [20].

En effet, le nouveau-né est particulièrement vulnérable à l'exposition aux PE du fait du développement des grands systèmes à cette période de la vie et notamment du développement du système endocrinien. Avec la période fœtale, le début de la période postnatale constitue une fenêtre de susceptibilité importante aux perturbateurs endocriniens avec la poursuite du développement du système nerveux central et la mise en place et l'activation des mécanismes de rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadique [13]. Cette susceptibilité est encore plus vraie chez les

**Tableau 1** Mots clés utilisés pour la recherche par excipients dans la base de données Thériaque®. *Keywords used to perform excipients search into Thériaque® database.*

| Forme parent                | Forme sel sodique                   |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Parahydroxybenzoate méthyle | Parahydroxybenzoate méthyle sodique |
| Parahydroxybenzoate ethyle  | Parahydroxybenzoate ethyle sodique  |
| Parahydroxybenzoate propyle | Parahydroxybenzoate propyle sodique |
| Parahydroxybenzoate butyle  | Parahydroxybenzoate butyle sodique  |

nouveau-nés prématurés dont le développement est moins avancé. Par ailleurs, il existe un risque de surexposition lié à l'immatrité de leur système métabolique car les parabènes subissent un important métabolisme hépatique conduisant à la formation de métabolites n'ayant pas démontré d'effets perturbateurs endocriniens [21]. Le prématuré présente donc un risque d'accumulation, en particulier lors d'une administration répétée. L'immatrité de la fonction rénale peut également participer à cette accumulation en diminuant l'excrétion de la forme inchangée des parabènes [22].

Cette population est également très exposée aux médicaments pour prévenir ou traiter les pathologies fréquemment retrouvées dans cette population. Leurs particularités physiologiques impliquent l'utilisation de formes pharmaceutiques susceptibles de contenir plus fréquemment des conservateurs comme les parabènes (formes orales liquides, formes injectables). Cette hypothèse est corroborée par deux études qui ont mis en évidence une augmentation des concentrations urinaires et sanguines en parabènes par rapport à une population adulte. Les auteurs avançant que l'utilisation intensive de médicaments contenant des parabènes chez les nouveau-nés prématurés hospitalisés dans des unités de soins intensifs conduirait à une exposition plus importante que la population générale [23,24].

C'est pourquoi il est indispensable d'explorer les pratiques de prise en charge des nouveau-nés, et plus particulièrement des prématurés, hospitalisés dans les services de néonatalogie français, afin d'identifier clairement dans quelle mesure les médicaments peuvent être une source d'exposition aux parabènes. Aussi, l'objectif de cette étude a été d'identifier les médicaments contenant des parabènes utilisés en réanimation néonatale dans un CHU français et de quantifier l'apport en parabènes via ces médicaments chez les nouveau-nés hospitalisés.

## Matériel et méthode

L'identification des médicaments comportant des parabènes dans leur formulation a été réalisée à partir de la base de données Thériaque®, par utilisation de la recherche de spécialités avec excipients. Quatre parabènes ont été recherchés sous leur forme parent ou sous leur forme de sel sodique (Tableau 1).

Tous les patients hospitalisés dès leur naissance dans le service de réanimation néonatale du CHU de Poitiers ont été inclus dans l'étude. La période d'inclusion s'est étendue du 01/11/2017 au 30/11/2017. Le recueil des prescriptions médicamenteuses a été réalisé tout au long de leur hospitalisation dans le service de réanimation néonatale. Pour chaque patient, les données suivantes ont été recueillies : poids, sexe, âge gestationnel à la naissance, durée d'hospitalisation ainsi que l'ensemble des prescriptions médicamenteuses (dénomination commune internationale, laboratoire pharmaceutique, posologie, voie d'administration, durée de traitement). Ces données ont été recueillies conformément au cadre de la méthodologie de référence MR-001 pour laquelle notre hôpital est accrédité par la CNIL.

La liste des médicaments prescrits aux nouveau-nés hospitalisés a été confrontée à celle des médicaments contenant des parabènes. Pour chaque médicament prescrit et identifié comme contenant des parabènes, un dosage par chromatographie liquide haute performance avec détection ultraviolet (HPLC-UV) a été réalisé afin de déterminer la quantité exacte de parabènes contenus dans chaque spécialité. Brièvement, l'appareillage chromatographique était composé d'une pompe L6220 (Merck®, Lyon, France), d'un injecteur 717 plus (Waters®, Milliford, USA), d'un détecteur UV 486 (Waters®, Milliford, USA) réglé sur une longueur d'onde de 254 nm et d'un système de traitement de données (EZchrom Elite®). La phase mobile (1 mL/min) était constituée d'un mélange d'acétonitrile et d'eau (40/60, v/v) tandis que la séparation était assurée par une colonne Purospher C18 Lichrocart (150 × 4,6 mm, 5 µm, Merck®, Lyon, France). L'extraction des parabènes a été réalisée en diluant au 20<sup>e</sup> chaque médicament dans de l'acétonitrile. La solution obtenue a ensuite été vortexée pendant 30 secondes et soniquée pendant 10 minutes. Après centrifugation, le supernatant a été dilué au 5<sup>e</sup> ou 20<sup>e</sup> avec un mélange eau/acétonitrile (50/50). Pour chaque médicament, le rendement d'extraction était compris entre 90 et 100 %.

La méthode de dosage a été validée selon les recommandations du chapitre « validation de méthode analytique » du guide GERPAC/SFPC [25]. La méthode était linéaire sur la gamme d'étalonnage utilisée ( $r^2 \geq 0,997$ ) et la limite de quantification était de 0,13 µg/mL. Les coefficients de variation de la précision étaient inférieurs à 12 % et les taux de recouvrement de la justesse étaient compris entre 92 et 113 %.

Les quantités journalières moyennes et cumulées de parabènes administrées ont été calculées en tenant compte des concentrations obtenues pour chaque spécialité et des doses prescrites. Ce calcul a été réalisé pour chaque enfant inclus. La fréquence d'exposition a été calculée en faisant le rapport du nombre de jours où un patient a reçu des médicaments contenant des parabènes sur le nombre total de jours d'hospitalisation du patient, exprimé en pourcentage.

Les patients ont été répartis en deux groupes en fonction de l'âge gestationnel à la naissance : nouveau-né à terme (âge gestationnel supérieur à 37 SA) ou prématurité (âge gestationnel inférieur à 37 SA). Une analyse statistique basée sur un test de Student a été réalisé pour comparer ces 2 groupes ( $\alpha = 5\%$ ).

**Tableau 2** Répartition des parabènes dans les spécialités pharmaceutiques.

*Distribution of parabens into pharmaceutical products.*

|                | Nombre de médicaments concernés | Proportion (%) |
|----------------|---------------------------------|----------------|
| Méthylparabène | 361                             | 91,8           |
| Ethylparabène  | 19                              | 4,8            |
| Propylparabène | 275                             | 70,0           |
| Butylparabène  | 4                               | 1,0            |

**Tableau 3** Proportion des formes galéniques parmi les spécialités identifiées comme comportant des parabènes.

*Ratio of galenic forms in parabens containing drugs.*

| Voie d'administration | Proportion (%) |
|-----------------------|----------------|
| Orale                 | 73,8           |
| Formes solides        | 18,1           |
| Formes liquides       | 76,9           |
| Formes semi-solides   | 5,0            |
| Injectable            | 4,7            |
| Externe               | 16,8           |
| Autres                | 4,7            |

## Résultats

La consultation de la base de données Thériaque® a permis de répertorier 393 spécialités pharmaceutiques contenant des parabènes, soit environ 4 % de l'ensemble des spécialités commercialisées en France. Le méthylparabène et le propylparabène sont les 2 composés les plus fréquemment retrouvés tandis que l'éthylparabène et le butylparabène sont plus faiblement présents. La répartition des différents parabènes dans les spécialités médicamenteuses est présentée dans le **Tableau 2**. Parmi les spécialités identifiées, 65 % comportaient une association de deux parabènes dont l'association méthylparabène et propylparabène est majoritaire. Concernant les voies d'administration, les formes galéniques destinées à la voie orale représentent 73,8 % des médicaments comportant des parabènes avec une majorité de formes liquides (suspensions buvables, sirops...) (**Tableau 3**).

L'étude prospective permettant le recueil des prescriptions médicamenteuses a permis d'inclure et de suivre vingt-deux enfants durant toute leur durée d'hospitalisation dans le service de réanimation néonatale du CHU de Poitiers. Parmi eux, 17 étaient des nouveau-nés prématurés (âge gestationnel moyen à la naissance :  $27,8 \pm 2,6$  SA) et 5 étaient des enfants nés à terme (âge gestationnel moyen à la naissance :  $38,2 \pm 1,8$  SA). Les principales caractéristiques de la population étudiée sont présentées dans le **Tableau 4**. Le choix d'inclure les nouveau-nés hospitalisés en réanimation néonatale s'est fait au regard des nombreux médicaments administrés à cette population.

Au total, 440 prescriptions ont été recueillies et analysées. Le nombre moyen de médicaments par prescription était de  $6,7 \pm 1,95$  et 81,1 % d'entre elles comportaient



Tableau 4 Caractéristiques de la population d'étude ( $n = 22$ ).  
*Characteristics of the study population ( $n = 22$ ).*

| Caractéristiques   |                 |
|--|-----------------|
| Sexe masculin  | 50 %            |
| Âge gestationnel moyen (semaines, moyenne $\pm$ écart-type)      | 30,5 $\pm$ 4,9  |
| Poids moyen à la naissance (kg, moyenne $\pm$ écart-type)        | 1,47 $\pm$ 0,79 |
| Durée d'hospitalisation moyenne (jour, moyenne $\pm$ écart-type) | 21,1 $\pm$ 17,7 |

au moins un médicament contenant des parabènes. Tous les enfants inclus dans l'étude ont été exposés au moins une fois au méthylparabène et au propylparabène tandis que 45,4 % ont été exposés à l'éthylparabène. Aucun enfant n'a été exposé au butylparabène. Tous composés confondus, la durée moyenne d'exposition des nouveau-nés était de 16,9  $\pm$  13,9 jours. Pour les nouveau-nés prématurés, la durée moyenne d'exposition était de 20,0  $\pm$  13,5 jours et la fréquence d'exposition moyenne de 78,6  $\pm$  20,1 %

en relation avec la durée moyenne d'hospitalisation qui était de 26  $\pm$  17,3 jours. Chez les nouveau-nés à terme, la durée moyenne d'exposition était de 3,2  $\pm$  2,6 jours et la fréquence d'exposition moyenne de 65,0  $\pm$  37,9 % en relation avec la durée moyenne d'hospitalisation qui était de 4,8  $\pm$  2,3 jours (Tableau 5).

Parmi les médicaments prescrits, huit d'entre ont été identifiés comme contenant des parabènes. Parmi eux, deux étaient des préparations hospitalières. Six étaient des formes orales liquides et deux des formes injectables prêts à l'emploi. Les dosages réalisés sur ces 8 médicaments sont présentés dans le Tableau 6. En moyenne, chaque nouveau-né a reçu 2,8 médicaments différents contenant des parabènes.

La quantité moyenne de parabènes reçue par chacun des 22 patients a été calculée à partir des concentrations obtenues lors du dosage par HPLC-UV des parabènes dans les spécialités concernées. Les quantités moyennes et cumulées de parabènes reçues par les nouveau-nés sont présentées dans le Tableau 5. Aucune différence significative n'a été observée entre les prématurés et les nouveau-nés à terme concernant les quantités moyennes ( $p = 0,271$ , 0,355 et 0,258 pour le méthyl-, l'éthyl- et le propylparabène respectivement). Pour les quantités cumulées, une

Tableau 5 Exposition des nouveau-nés hospitalisés aux parabènes via les médicaments.  
*Exposure of hospitalized neonates to parabens through medicines.*

|   | Méthyle             | Éthyle              | Propyle           |
|---|---------------------|---------------------|-------------------|
| Population globale  |                     |                     |                   |
| Fréquence d'exposition  |                     |                     |                   |
| Moyenne $\pm$ écart-type (%)                                  | 75,5 $\pm$ 24,8     | 19,1 $\pm$ 24,8     | 75,5 $\pm$ 24,8   |
| Minimum–maximum   | 25,0–100,0          | 0,0–85,0            | 25,0–100,0        |
| Quantité journalière reçue                                    |                     |                     |                   |
| Moyenne $\pm$ écart-type ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ ) | 450,9 $\pm$ 286,4   | 329,9 $\pm$ 102,4   | 45,1 $\pm$ 26,1   |
| Minimum–maximum   | 109,7–1096,2        | 223,3–448,3         | 10,4–90,2         |
| Quantité cumulée reçue  |                     |                     |                   |
| Moyenne $\pm$ écart-type ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )          | 6982,9 $\pm$ 7580,2 | 1185,3 $\pm$ 2034,5 | 702,5 $\pm$ 772,4 |
| Minimum–maximum   | 453,3–22207,6       | 0–6085,2            | 43,2–2834,2       |
| Prématurés  |                     |                     |                   |
| Fréquence d'exposition  |                     |                     |                   |
| Moyenne $\pm$ écart-type (%)                                  | 78,6 $\pm$ 20,1     | 15,9 $\pm$ 25,5     | 78,6 $\pm$ 20,1   |
| Minimum–maximum   | 33,3–100,0          | 0,0–85,0            | 33,3–100,0        |
| Quantité journalière reçue                                    |                     |                     |                   |
| Moyenne $\pm$ écart-type ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ ) | 414,6 $\pm$ 294,1   | 303,3 $\pm$ 100,1   | 41,5 $\pm$ 26,1   |
| Minimum–maximum   | 109,7–1096,2        | 223,9–447,2         | 10,4–88,6         |
| Quantité cumulée reçue  |                     |                     |                   |
| Moyenne $\pm$ écart-type ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )          | 8618,7 $\pm$ 7922,3 | 1394,2 $\pm$ 2277,6 | 865,7 $\pm$ 810,4 |
| Minimum–maximum   | 453,3–22207,6       | 0–6085,2            | 43,24–2834,2      |
| Nouveau-nés à terme   |                     |                     |                   |
| Fréquence d'exposition  |                     |                     |                   |
| Moyenne $\pm$ écart-type (%)                                  | 65,0 $\pm$ 37,9     | 30,0 $\pm$ 20,9     | 65,0 $\pm$ 37,9   |
| Minimum–maximum   | 25,0–100,0          | 0,0–50,0            | 25,0–100,0        |
| Quantité journalière reçue                                    |                     |                     |                   |
| Moyenne $\pm$ écart-type ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ ) | 572,0 $\pm$ 249,0   | 360,7 $\pm$ 123,2   | 57,3 $\pm$ 25,0   |
| Minimum–maximum   | 250,6–818,2         | 223,9–448,3         | 28,5–90,2         |
| Quantité cumulée reçue  |                     |                     |                   |
| Moyenne $\pm$ écart-type ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )          | 1421,5 $\pm$ 758,8  | 475,1 $\pm$ 404,8   | 147,4 $\pm$ 81,1  |
| Minimum–maximum   | 713,7–2539,4        | 0–1119,4            | 65,7–253,8        |

Tableau 6 Teneur en parabènes des médicaments prescrits et identifiés comme contenant des parabènes ( $\mu\text{g/mL}$  ; moyenne  $\pm$  écart-type,  $n=3$ ).  
*Parabens content of drugs prescribed and identified as parabens containing drugs ( $\mu\text{g/mL}$  ; mean  $\pm$  standard deviation,  $n=3$ ).*

|               | Méthyle            | Éthyle          | Propyle          |
|---------------|--------------------|-----------------|------------------|
| Spécialité 1  | 1416,2 $\pm$ 36,5  | 0               | 169,9 $\pm$ 5,2  |
| Spécialité 2  | 873,2 $\pm$ 60,7   | 0               | 83,3 $\pm$ 5,9   |
| Spécialité 3  | 285,5 $\pm$ 61,9   | 179,1 $\pm$ 9,4 | 26,3 $\pm$ 5,3   |
| Spécialité 4  | 920,8 $\pm$ 40,8   | 0               | 141,6 $\pm$ 7,2  |
| Spécialité 5  | 4519,9 $\pm$ 303,6 | 0               | 522,1 $\pm$ 53,1 |
| Spécialité 6  | 1113,1 $\pm$ 42,5  | 0               | 82,5 $\pm$ 5,2   |
| Préparation 1 | 343,2 $\pm$ 5,0    | 0               | 31,4 $\pm$ 0,9   |
| Préparation 2 | 321,0 $\pm$ 19,9   | 0               | 29,5 $\pm$ 1,6   |

différence significative a été observée entre les 2 groupes pour le méthyl- et le propylparabène ( $p < 0,01$ ) mais pas pour l'éthylparabène ( $p = 0,13$ ).

## Discussion

Cette étude met en évidence le fait que les nouveau-nés hospitalisés en réanimation néonatale sont particulièrement exposés aux parabènes via les médicaments qui leur sont administrés. En effet, l'ensemble des nouveau-nés inclus dans notre étude prospective ont reçu au moins une fois du méthyl- et du propylparabène durant leur hospitalisation tandis que près de la moitié ont été exposés à l'éthylparabène. En revanche, aucun enfant n'a été exposé au butylparabène. Cette différence d'exposition entre les composés de la même famille est cohérente avec leur répartition dans les spécialités pharmaceutiques. En effet, le méthyl- et le propylparabène sont les parabènes les plus retrouvés dans la composition des médicaments, notamment en combinaison afin d'obtenir un effet synergique. L'effet antimicrobien augmente avec la taille de la chaîne alkyl tandis que la solubilité diminue en fonction du même paramètre. Par ailleurs, si les médicaments impliqués appartiennent à des classes pharmaceutiques différentes (diurétiques, antalgiques, anti-infectieux...), ils ont tous une forme galénique liquide, souvent présentée en flacon multidoses, dont la stabilité (microbienne et physico-chimique) peut être plus difficile à maintenir. Ces formes nécessitent alors l'ajout de conservateurs en tant qu'excipients pour répondre aux critères de la Pharmacopée Européenne [26]. De plus, les nouveau-nés hospitalisés en réanimation, étant donné leurs pathologies et leurs caractéristiques physiologiques, reçoivent plus souvent des traitements injectables ainsi que des formes orales liquides. Parmi les médicaments impliqués, deux étaient des préparations hospitalières, il est donc important d'en tenir compte pour évaluer le risque d'exposition mais également d'inciter les pharmaciens hospitaliers au développement et à l'utilisation de préparations sans parabènes [27].

Un autre facteur de variation d'exposition identifié dans cette étude est l'âge gestationnel à la naissance. Ainsi, si les nouveau-nés prématurés reçoivent des doses journalières

moyennes moins importantes que les nouveau-nés à terme, quel que soit le parabène évalué, la fréquence d'exposition est plus importante dans cette population, excepté pour l'éthylparabène. Un nouveau-né prématuré aura donc plus de risque d'être exposé au méthyl- et au propylparabène qu'un enfant né à terme. Par ailleurs, la dose cumulée reçue sur la durée d'hospitalisation est plus importante chez le prématuré pour les trois parabènes.

Ces données, même si obtenues sur un échantillon restreint, démontrent que les nouveau-nés hospitalisés sont particulièrement à risque d'être exposés aux parabènes via les médicaments, en plus des autres sources d'exposition potentielles (alimentation, cosmétiques). Nos résultats montrent également une variabilité importante en termes d'exposition aux parabènes pouvant s'expliquer par la diversité des pathologies et donc des traitements prescrits dans cette population de patients.

Peu d'études se sont intéressées à l'exposition des nouveau-nés aux excipients des médicaments de façon générale et aux parabènes en particulier. Cependant, toutes sont en accord avec nos résultats. Trois études, menées en Estonie, au Brésil et en Espagne, ont décrit l'exposition des nouveau-nés aux excipients des médicaments considérés comme nocifs, incluant les parabènes [28–30]. Ces études étaient rétrospectives et, comme nous, limitées à un unique service (deux pour l'Estonie). Nos résultats sont en accord avec ces études qui ont mises en évidence la prescription très fréquente de médicaments contenant des parabènes chez les nouveau-nés hospitalisés. Elles ont également montré que ces prescriptions étaient plus fréquentes chez les enfants prématurés. En revanche, aucune d'entre elles n'a quantifié cette exposition aux parabènes via les médicaments.

Une autre étude, réalisée dans un grand nombre de services de néonatalogie (81 services issue de 21 pays européens dont la France) mais réalisée sur une seule journée de prescription, révèle que 19 % des prescriptions comportaient des médicaments contenant des parabènes et que 43 % des nouveau-nés étaient exposés aux parabènes via les médicaments administrés, ce qui est inférieur au taux constaté dans notre étude. Cette différence avec nos résultats pourrait être imputable aux variations de prise en charge thérapeutique des nouveau-nés observées dans cette même étude [31]. Cependant, la fréquence d'exposition était également d'autant plus importante que le niveau de prématurité était grand, avec une proportion d'environ 55 % pour les très grands prématurés (âge gestationnel médian de 183 jours) contre près de 35 % chez les nouveau-nés à terme. Mais, comme les études précédentes, cette étude n'a pas quantifié l'exposition aux parabènes.

Une seule étude a estimé la quantité de parabènes (méthyl et propylparabène) reçue par des nouveau-nés hospitalisés via l'administration de médicaments [24]. Cette étude rétrospective réalisée dans 5 services de néonatalogie (4 en Angleterre et 1 en Estonie) a recueilli les prescriptions de 181 nouveau-nés hospitalisés nés à terme ou prématurément. Chaque enfant avait reçu en moyenne 32,5 et 20,3 doses de méthyl et propylparabène respectivement, majoritairement par voie orale. La moyenne de la durée d'administration des médicaments contenant ces parabènes était de 14 jours, avec des doses journalières moyennes estimées à 0,58  $\pm$  0,31 mg/kg et 0,14  $\pm$  0,10 mg/kg de méthyl

et de propylparabène respectivement. Cette étude rétrospective a également mesuré les concentrations sanguines en parabènes de cette population. Les concentrations de méthylparabène mesurées dans le sang des nouveau-nés (âge gestationnel moyen à la naissance de 222 jours) étaient de 13,0 ng/mL soit près de dix fois plus élevées que les taux mesurés dans le plasma d'adultes sains (1,57 ng/mL) [32]. Le propylparabène a été retrouvé à des concentrations supérieures à 10 ng/mL dans plus de 25 % des prélèvements réalisés chez ces nouveau-nés hospitalisés alors que la concentration médiane retrouvée chez l'adulte sain était de 0,32 ng/mL dans l'étude danoise. Par ailleurs, les taux sanguins retrouvés chez ces nouveau-nés recevant des médicaments contenant des parabènes sont bien supérieurs à ceux mesurés à l'accouchement dans le sang de cordon (environ 2,2 et 0,3 ng/mL en médiane, pour le méthyl- et le propylparabène respectivement) [33]. Dans une autre étude, le méthyl- et le propylparabène ont été recherchés dans les urines et détectés chez tous les nouveau-nés étudiés avec des taux médians respectivement de 243 et 17 ng/mL pour le méthyl- et le propylparabène respectivement. Ici aussi, comparativement à l'adulte sain, les taux mesurés sont supérieurs dans la population prématurée. Les auteurs avancent que l'utilisation intensive de médicaments contenant des parabènes chez les nouveau-nés prématurés hospitalisés dans des unités de soins intensifs conduirait à une exposition plus importante que la population générale.

Nos résultats, en accord avec ces études, montrent que les médicaments constituent une source d'exposition non-négligeable aux parabènes chez les nouveau-nés prématurés. De plus, l'immaturité de leur système métabolique est susceptible de favoriser la surexposition de cette population. En effet, les parabènes subissent un important métabolisme hépatique conduisant à la formation de métabolites n'ayant pas démontré d'effets perturbateurs endocriniens. Quel que soit le parabène, il est principalement métabolisé en acide 4-hydroxybenzoïque par des carboxylestérases (hCE1 et hCE2) ou conjugué sous forme de sulfate ou de glucuronide par des sulfotransférases et des UDP glucuronotransférases (UGT) présentes dans le foie [34]. Or, les données *in vitro* ont montré que l'expression et l'activité des carboxylestérases humaines étaient liées à l'âge, avec des niveaux significativement plus bas dans les premiers stades de vie. Le nouveau-né et a fortiori le prématuré présentent donc un risque d'accumulation des parabènes, en particulier lors d'une administration répétée comme cela peut être le cas pour les médicaments.

Actuellement, il n'existe pas de réglementation interdisant l'utilisation des parabènes en France mais seulement des recommandations limitant leur utilisation [35,36]. La seule valeur toxicologique de référence pour les parabènes est la dose journalière admissible (DJA) fixée à 10 mg/kg/j par l'OMS pour le méthyl- et l'éthylparabène. Aucune DJA n'a été défini pour le propylparabène mais une Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL) a été proposé à 10 mg/kg/j [37]. L'exposition moyenne à ces parabènes obtenue dans notre étude est inférieure à ces valeurs mais le calcul de ces valeurs seuils ne prend pas en compte l'effet reconnu à faible dose des PE. Concernant plus particulièrement les parabènes, plusieurs études ont démontré l'effet oestrogénique de ces composés à de

faibles doses, avec des concentrations plasmatiques et/ou urinaires faibles [12,16,17,38]. Parallèlement, une étude a estimé que l'exposition moyenne de la population générale à ces composés était de l'ordre de 1,03, 0,83 et 0,59 mg/kg/j pour le méthyl-, le propyl- et l'éthylparabène respectivement, démontrant que la prise en compte du risque des parabènes, et des PE en général, doit également se faire à des valeurs d'exposition plus faible que les valeurs toxicologiques de référence [39].

## Conclusion

Les résultats de notre étude soulignent que les médicaments utilisés chez les nouveau-nés hospitalisés dans un service de réanimation néonatale français sont une source non-négligeable d'exposition aux parabènes, à la fois en termes de fréquence d'exposition et de doses journalières reçues. Ces résultats doivent inciter les professionnels de santé à privilégier des prises en charge thérapeutiques sans parabènes, notamment par l'étude des pratiques de prises en charge des nouveau-nés, et plus particulièrement des prématurés, hospitalisés dans les services de néonatalogie français. Il est également important d'inciter les industriels à proposer des solutions sans parabènes, notamment pour les spécialités identifiées comme indispensables dans la prise en charge des enfants et plus particulièrement des nouveau-nés.

Enfin, si notre étude met en évidence l'exposition aux parabènes des enfants hospitalisés en réanimation néonatale via les médicaments, il serait intéressant d'évaluer la part attribuable au médicament dans l'exposition globale de ces enfants car d'autres sources d'exposition existent, notamment à travers les produits de consommation courante.

## Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

## Références



- [1] World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases; 2010. p. 2011.
- [2] Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007;261(5):412–7.
- [3] Hanson M. The birth and future health of DOHaD. *J Dev Orig Health Dis* 2015;6(05):434–7.
- [4] Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ Health Glob Access Sci Source* 2012;11(1):42.
- [5] Bergman Å, Heindel J, Jobling S, Kidd K, Zoeller RT. State of the science of endocrine disrupting chemicals, 211; 2012. p. S3. World Health Organization.
- [6] Commission et. Regulation (EU) 2018/605 of 19 April 2018 amending Annex II to Regulation (EC) No 1107/2009 by setting out scientific criteria for the determination of endocrine disrupting properties (Text with EEA relevance.) [Internet]; 2018 [Journal officiel de l'Union européenne, <http://data.europa.eu/eli/reg/2018/605/oj/eng>, OJ L, 32018R0605].

- [7] Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr Rev* 2009;30(4):293–342.
- [8] Kortenkamp A, Martin O, Faust M, Evans R, Mckinlay R, Orton F, et al. State of the art assessment of endocrine disrupters; 2011. Project contract number 070307/2009/550687/SER/D3.
- [9] European Environment Agency. The impacts of endocrine disrupters on wildlife, people and 378 their environments – The Weybridge+15 (1996-2011) report [Internet], 2/2012; 2012. p. 379 [European Environment Agency, <http://www.eea.europa.eu/publications/the-impacts-of-endocrine-disrupters>, 116].
- [10] WHO. Endocrine disrupters. Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health; 2012 [World Health Organization, [http://www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html), cité 24 avr 2017].
- [11] Skakkebaek NE, Toppari J, Söder O, Gordon CM, Divall S, Draznin M. The exposure of fetuses and children to endocrine disrupting chemicals: a European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) and Pediatric Endocrine Society (PES) call to action statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(10):3056–8.
- [12] Nowak K, Ratajczak-Wrona W, Górska M, Jabłońska E. Parabens and their effects on the endocrine system. *Mol Cell Endocrinol* 2018;474:238–51.
- [13] INSERM. Expertise collective-reproduction et environnement; 2011. p. 89.
- [14] Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol* 2004;24(1):5–13.
- [15] Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol* 2008;28(5):561–78.
- [16] Giulivo M, Lopez de Alda M, Capri E, Barceló D. Human exposure to endocrine disrupting compounds: their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environ Res* 2016;151:251–64.
- [17] Harley KG, Berger KP, Kogut K, Parra K, Lustig RH, Greenspan LC, et al. Association of phthalates, parabens and phenols found in personal care products with pubertal timing in girls and boys. *Hum Reprod* 2019;34(1):109–17.
- [18] Rapport au Parlement relatif aux perturbateurs endocriniens; 2014. Rapport au parlement.
- [19] European Medicine Agency. Reflection paper on the use of methyl-and propylparaben as excipients in human medicinal products for oral use; 2013.
- [20] Académie Nationale de Pharmacie. Parabènes et médicaments : un problème de santé publique ? Recommandations adoptées suite à la séance du 6 mars 2013 par le Conseil du 22 mai 2013, 27; 2013. Académie Nationale de Pharmacie.
- [21] Wood AJJ, Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, et al. Developmental pharmacology – drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med* 2003;349(12):1157–67.
- [22] Hindmarsh KW, John E, Asali LA, Frenc HJN, Williams GL, McBride WG. Urinary excretion of methylparaben and its metabolites in preterm infants. *J Pharm Sci* 1983;72(9):1039–41.
- [23] Calafat AM, Weuve J, Ye X, Jia LT, Hu H, Ringer S, et al., Exposure to Bisphenol A. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect* 2009;117(4):639–44.
- [24] Mulla H, Yakkundi S, McElnay J, Lutsar I, Metsvaht T, Varendi H, et al. An observational study of blood concentrations and kinetics of methyl- and propyl-parabens in neonates. *Pharm Res* 2015;32(3):1084–93.
- [25] Sautou V, Brossard D, Crauste-Manciet S, Fleury-Souverain S, Lagarce F, Odou P, et al. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations; 2013. GERPAC.
- [26] European Pharmacopoeia. Microbiological quality of non-sterile products for pharmaceutical use. 2(v01); 2011. p. 507 [European Pharmacopoeia, 9.2. 5.1.4].
- [27] Binson G, Beuzit K, Migeot V, Marco L, Troussier B, Venisse N, et al. Preparation and physicochemical stability of liquid oral dosage forms free of potentially harmful excipient designed for pediatric patients. *Pharmaceutics* 2019; 11(4):190.
- [28] Lass J, Naelapää K, Shah U, Käär R, Varendi H, Turner MA, et al. Hospitalised neonates in Estonia commonly receive potentially harmful excipients. *BMC Pediatr* 2012;12(1):668.
- [29] Souza A, Santos D, Fonseca S, Medeiros M, Batista L, Turner M, et al. Toxic excipients in medications for neonates in Brazil. *Eur J Pediatr* 2014;173(7):935–45.
- [30] Garcia-Palop B, Movilla Polanco E, Cañete Ramirez C, Cabañas Poy MJ. Harmful excipients in medicines for neonates in Spain. *Int J Clin Pharm* 2016;38(2):238–42.
- [31] Nellis G, Metsvaht T, Varendi H, Toompere K, Lass J, Mesek I, et al. Potentially harmful excipients in neonatal medicines: a pan-European observational study. *Arch Dis Child* 2015;100(7):694–9.
- [32] Frederiksen H, Jørgensen N, Andersson A-M. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2011;21(3):262–71.
- [33] Pycke BFG, Geer LA, Dalloul M, Abulafia O, Halden RU. Maternal and fetal exposure to parabens in a multiethnic urban U.S. population. *Environ Int* 2015;84:193–200.
- [34] Shin M-Y, Shin C, Choi JW, Lee J, Lee S, Kim S. Pharmacokinetic profile of propyl paraben in humans after oral administration. *Environ Int* 2019;130:104917.
- [35] Commission européenne. Règlement (UE) n° 1004/2014 de la Commission du 18 septembre 2014 modifiant l'annexe V du règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE [Internet]; 2014 [Journal officiel de l'Union européenne, <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/1004/oj/fra>, OJ L, 32014R1004].
- [36] Code de la santé publique - article L5131-1. Code de la santé publique.
- [37] Scientific Committee on Consumer Products (SCCP). Extended opinion on the safety evaluation of parabens.
- [38] Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, Hass U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxicol* 2010;30(2):301–12.
- [39] Cowan-Ellsberry CE, Robison SH. Refining aggregate exposure: example using parabens. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009;55(3):321–9.

**ANNEXE 2 : PREPARATION AND PHYSICOCHEMICAL STABILITY OF LIQUID  
ORAL DOSAGE FORMS FREE OF POTENTIALLY HARMFUL EXCIPIENT  
DESIGNED FOR PEDIATRIC PATIENTS**

Article

# Preparation and Physicochemical Stability of Liquid Oral Dosage Forms Free of Potentially Harmful Excipient Designed for Pediatric Patients

Guillaume Binson <sup>1,2,3</sup>, Karine Beuzit <sup>2</sup>, Virginie Migeot <sup>1,3</sup>, Léa Marco <sup>2</sup>, Barbara Troussier <sup>2</sup>, Nicolas Venisse <sup>1,4</sup>  and Antoine Dupuis <sup>1,2,3,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Health-Endocrine Disruptors-EXposome (HEDEX), CIC Inserm 1402, University Hospital of Poitiers, Poitiers 86021, France; guillaume.binson@chu-poitiers.fr (G.B.); virginie.migeot@univ-poitiers.fr (V.M.); n.venisse@chu-poitiers.fr (N.V.)
- <sup>2</sup> Department of Pharmacy, University Hospital of Poitiers, Poitiers 86021, France; k.beuzit@chu-poitiers.fr (K.B.); lea.marco@hotmail.fr (L.M.); b.troussier@gmail.com (B.T.)
- <sup>3</sup> School of Medicine and Pharmacy, University of Poitiers, Poitiers 86073, France
- <sup>4</sup> Department of Pharmacokinetics, University Hospital of Poitiers, Poitiers 86021, France
- \* Correspondence: antoine.dupuis@univ-poitiers.fr; Tel.: +33-5-49-43-37-68; Fax: +33-5-49-45-39-72

Received: 15 March 2019; Accepted: 16 April 2019; Published: 18 April 2019



**Abstract:** Dexamethasone, hydrochlorothiazide, spironolactone, and phenytoin are commonly used in neonates, but no age-appropriate formulation containing these active pharmaceutical ingredients (APIs) is commercially available. Thus, pharmaceutical compounding of the liquid oral dosage form is required to enable newborn administration. A problem common to the compounded preparations described in the literature is that they include potentially harmful excipients (PHEs). Therefore, the aim of this study was to evaluate the feasibility of compounding oral liquid dosage forms free of PHE, containing dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, or spironolactone and to assess their physicochemical stability. Due to the poor water solubility of the targeted APIs, oral suspensions were compounded using Syrspend®SF-PH4 Dry, a suspending vehicle free of PHE. Four HPLC coupled to UV spectrometry (HPLC-UV) stability-indicating methods were developed and validated according to international guidelines to assay the strength of the targeted APIs. Whatever storage condition was used ( $5 \pm 3$  °C or  $22 \pm 4$  °C), no significant degradation of API occurred in compounded oral suspensions. Overall, the results attest to the physical and chemical stability of the four oral liquid dosage forms over 60 days under regular storage temperatures. Finally, the use of the proposed oral suspensions provides a reliable solution to reduce the exposure of children to potentially harmful excipients.

**Keywords:** liquid oral dosage form; physicochemical stability; potentially harmful excipient; pediatric patients; compounded preparation

## 1. Introduction

Oral medicine administration to the pediatric population still remains a challenge, particularly due to a frequent lack of age-appropriate formulations, which raises a concern about dose accuracy [1]. Moreover, several factors specific to the pediatric population, such as the ability to swallow, palatability issues, etc., may hamper the administration of oral medication [2]. Indeed, most commercially available medicines are designed for adults and do not provide ease of use for children [3]. Beyond the efforts of health authorities to promote the development of pediatric medicines, many medicinal products are authorized only for adults and are not currently available in formulations suitable for administration to the pediatric population [4]. Consequently, caregivers or parents frequently modify medicines used

off-label before administration in children, leading to dose error risk or inaccurate dosing, as well as stability and/or bioavailability issues pertaining to the drug [5]. In order to avoid manipulation of the dosage form, pharmaceutical compounding preparation may be proposed. Among the different formulations of compounded preparations available, liquid oral dosage forms represent an interesting alternative in children, providing increased dose flexibility and ease of swallowing compared to solid oral forms [4]. However, liquid dosage forms may require ingredients that are not child-friendly (suspending vehicles, preservatives, etc.).

Dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, and spironolactone are four Active Pharmaceutical Ingredients (APIs) commonly used in neonates [6–8]. However, in many countries, formulations suitable for oral administration of these APIs to children are not currently commercially available. According to the literature, several methods to compound oral liquid preparations containing these APIs have been described [9–15]. These methods have used suspending vehicles formulated using suspending agents (sodium carboxymethylcellulose, xanthan gum), dispersant/humectants (propylene glycol, dimethicone), sweetening agents (sodium saccharin, sucrose), preservatives (methylparaben, propylparaben, sodium benzoate), and water as a solvent. A problem common to all these formulations is that they include potentially harmful excipients (PHEs), such as parabens or sodium benzoate. Exposure of neonates to PHEs is a safety concern since they are associated with toxicity issues, allergic reactions, and intolerance [16,17]. Indeed, sodium benzoate may induce severe hyperbilirubinemia due to its capacity to displace bilirubin from albumin [18]. Consequently, sodium benzoate is contraindicated in newborns less than eight weeks old. On the other hand, parabens are suspected of being endocrine disruptors [19]. Developmental exposure to endocrine-disrupting chemicals, during fetal or early life, is associated with a wide range of disorders and could increase the risk of disease later in life [20,21]. In this context, the European Medicine Agency (EMA) recommends avoidance of their use wherever possible, particularly in pediatric formulations [22]. Development of such formulations requires, as for any medicine, physicochemical stability studies, particularly, since PHE may have anti-oxidant properties, such as parabens or benzoic acid [23].

In light of this, the objective of this study was to evaluate the feasibility of compounding oral liquid dosage forms free of potentially harmful excipients, containing dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, or spironolactone as APIs and to assess their physicochemical stability.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals and Reagents

Syrspend®SF PH4 Dry (batch number: 15H13-B03-312986) and spironolactone (batch number: 17E22-B11-335448) were purchased from Fagron (Thiais, France), hydrochlorothiazide (batch number: 005851) and phenytoin (batch number: 006520) were purchased from Inresa (Bartenheim, France), and dexamethasone acetate (batch number: 15090168/A) was purchased from Cooper (France). Sterile water was purchased from Fresenius (Versylene®, Sèvres, France).

HPLC-grade methanol and acetonitrile were purchased from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France), and ultrapure water was provided using a Direct-Q UV3 water purification system (Millipore®, Guyancourt, France).

### 2.2. Feasibility Study

Oral liquid dosage forms were compounded at a target concentration of 5 mg/mL for spironolactone, dexamethasone, and phenytoin and 2 mg/mL for hydrochlorothiazide. Since these four APIs are poorly to very poorly soluble in water (0.089, 0.722, 0.032, and 0.022 mg/mL, for dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, and spironolactone, respectively [24]), use of a suspending vehicle was mandatory in order to prepare a liquid dosage form. Syrspend®SF PH4 Dry, a powder ensuring correct drug suspension and designed to prepare oral liquid dosage form, was chosen since this

marketed product is formulated mostly with starch, considered as an inert excipient, and does not contain any PHE.

The oral suspensions were prepared in accordance with the French guidelines [25] according to the following standard operating procedure:

- First, the exact amount of API powder was weighed in order to obtain the targeted concentration.
- API powder was added to 13 g of Syrspond®SF PH4 Dry and triturated in a mortar until homogeneity was achieved.
- Subsequently, sterile water was gently added, while stirring continuously, until reaching a final volume of 200 mL.
- Finally, the suspension was bottled in a 20 mL amber type I glass container.

The entire procedure was carried out in a clean area, in order to limit microbiological contamination.

In order to verify that the formulations were providing correct dispersion of API in the suspending vehicle, the strengths of API in the compounded preparations were assessed. In this way, the concentrations ( $n = 6$ ) of three different batches were determined for each oral liquid dosage form, using high-performance liquid chromatography coupled to UV spectrometry (HPLC-UV) methods described below. One milliliter oral suspension samples ( $n = 3$ ), collected after shaking in order to obtain uniform dispersion of the API, were diluted in methanol (1:10,  $v:v$ ), centrifuged at 3500 g for 10 min, and supernatants were then diluted in methanol (1:10,  $v:v$ ) before injecting onto the column. According to the United States Pharmacopoeia, dose content uniformity is verified if every compounded preparation contains no less than 90% and no more than 110% of the theoretical concentration [26].

### 2.3. Stability Study

In order to investigate the influence of temperature on the physical and chemical stability properties of the oral suspensions, three bottles from different batches of each API were stored throughout the study duration either at room temperature ( $22 \pm 4$  °C) or under controlled refrigeration ( $5 \pm 3$  °C) (temperature was monitored daily).

API concentrations were determined at days 0, 7, 14, 30, 42, and 60, using the HPLC-UV methods described below. Oral suspension samples, collected after shaking in order to obtain uniform dispersion of the API, were diluted in methanol (1:10,  $v:v$ ), centrifuged at 3500 g for 10 min, and supernatants were then diluted in methanol (1:10,  $v:v$ ) before injecting onto the column.

According to the US Pharmacopoeia, compounded preparations are considered to be stable if the API concentration remains within 90–110% of the initial value (day 0) [27].

Osmolality and pH were also determined during the stability study, using a vapor pressure osmometer (VAPRO®, Wescor, Fontenay, France) and a pH-meter (EcoScan®, Eutech Instrument, Fontenay, France), respectively. In addition, physical appearance was investigated by visual inspection performed in a transparent glass vial, in order to check the initial color and opalescent aspect of the suspension.

### 2.4. Analytical Method Development and Validation

HPLC-UV analysis was performed using a chromatographic system, including a binary gradient solvent delivery pump (Hitachi L-2130®, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) and an autosampler (Hitachi L-2200®, VWR, Fontenay-sous-Bois, France), connected to a UV-visible detector (SPD-6A®, Shimadzu, Marne-la-Vallée, France). Chromatographic data were recorded and processed using EasyChrom® software integrator (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). The system was operated at ambient temperature. Injection volume was settled at 25  $\mu$ L. For each API, a specific HPLC-UV stability-indicating method was developed and fully validated in order to determine API concentrations. The chromatographic conditions used for each API are shown in Table 1. Validation of each analytical method was performed in accordance with ICH Q2(R1) international guidelines using the following criteria: linearity accuracy (precision and trueness) and specificity [27].



**Table 1.** Characteristics of the different analytical methods developed to perform dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, or spironolactone assay.

|                           | Dexamethasone                                      | Hydrochlorothiazide  | Phenytoin                           | Spironolactone                  |
|---------------------------|--|--|-------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Mobile Phase</b>       | Acetonitrile and water (50:50, v:v)                | Methanol and water (20:80, v:v) pH adjusted to 4.5 using acetic acid | Acetonitrile and water (60:40, v:v) | Methanol and water (70:30, v:v) |
| <b>Flow rate (mL/min)</b> | 1.0  | 1.5  | 1.0                                 | 1.0                             |
| <b>Column</b>             | Purospher®STAR RP-18 endcapped (5 µm) 150 × 4.6 mm |  |                                     |                                 |
| <b>λ (nm)</b>             | 238  | 224  | 238                                 | 238                             |

#### 2.4.1. Calibration Curve

To assess API concentration in the compounded preparations, a calibration method was performed for each API. Calibration range was determined according to API target concentrations. For dexamethasone, phenytoin, and spironolactone, initial 100 µg/mL API solutions were prepared and then diluted using methanol to obtain a five-point calibration curve (0, 12.5, 25, 50, and 100 µg/mL). For hydrochlorothiazide, an initial 100 µg/mL solution was prepared and then diluted using methanol to obtain a six-point calibration curve (0, 12, 14, 20, 24, and 28 µg/mL). Calibration curves were generated by linear least-squares regression of the peak area versus API concentrations profiles.

#### 2.4.2. Linearity and Matrix Effect

Five calibration curves were prepared on five different days. Linearity was assessed through the analysis of correlation coefficient ( $r^2$ ), y-intercept and slope of the linear regression line, and residual values (expressed as the percentage of the theoretical value).

Matrix effect was assessed comparing calibration curves prepared in methanol versus calibration curves obtained using Syrspend®SF PH4 Dry. Dilution was performed using a methanol solution containing 10% of the suspending vehicle in order to mimic the exact composition of samples obtained after dilution of the oral suspensions before HPLC-UV analysis. The y-intercept and slope of linear regression lines were compared using a Student t-test ( $\alpha = 0.05$ ) to assess matrix effect.

#### 2.4.3. Accuracy and Limit of Quantification

Accuracy was investigated by assessing the precision and trueness of the method. For each API, quality controls (QC) were prepared in methanol at a level of 50 µg/mL for dexamethasone, phenytoin, and spironolactone and 20 µg/mL for hydrochlorothiazide, according to diluted oral suspension concentrations. Precision was assessed through the determination of the relative standard deviation (RSD) of the mean concentration determined for each QC, on the same day for repeatability ( $n = 6$ ) and over three days for intermediate precision ( $n = 18$ ). Trueness was assessed by determination of the percent recovery of the expected concentrations of QC used during the precision study. The limits of quantification (LOQ) were settled as the lowest point of the corresponding calibration curves.

#### 2.4.4. Specificity and Stability-Indicating Performance

The stability-indicating capability of the method was evaluated by verifying that degradation products did not coelute with intact APIs. To ensure that no degradation products were coeluting with API, a photodiode array detector (Waters 2996®, Guyancourt, France) was used to obtain a three-dimensional chromatogram. Each API oral suspension was subjected to severe stress (heat, acidic and basic conditions, oxidation) in accordance with ICH Q1 international guidelines. Samples were then injected onto the column to compare chromatograms to those obtained with non-degraded suspension and to perform peak purity check test.

### 3. Results

#### 3.1. Method Validation

A specific HPLC-UV method was developed and fully validated for each of the four APIs. Calibration curves provided adequate linearity over the studied ranges since correlation coefficients were greater or equal to 0.9992 and residual values were lower, less than or equal to 5.0% (Table 2). Furthermore, the mean slope and y-intercept values of the calibration curves obtained using Syrspend®SF PH4 Dry were not statistically different from those obtained using methanol ( $p$  were all greater or equal to 0.17), evidencing the lack of matrix effect using this suspending vehicle. In such a case, calibration curves may be performed using methanol dilution of API standard solutions, rendering HPLC-UV analysis easier and faster.

**Table 2.** Performance parameters obtained during linearity assessment of the different analytical methods developed to perform dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, or spironolactone assay.

|                           | Dexamethasone | Hydrochlorothiazide | Phenytoin | Spironolactone |
|---------------------------|---------------|---------------------|-----------|----------------|
| Calibration range (mg/mL) | 1.25–10       | 12–28               | 1.25–10   | 1.25–10        |
| $r^2$                     | 0.9996        | 0.9996              | 0.9998    | 0.9992         |
| Maximum residual value    | 5.0%          | 2.4%                | 3.5%      | 5.0%           |
| S/N                       | 438           | 138                 | 349       | 164            |

S/N: signal to noise ratio at the lowest standard concentration.

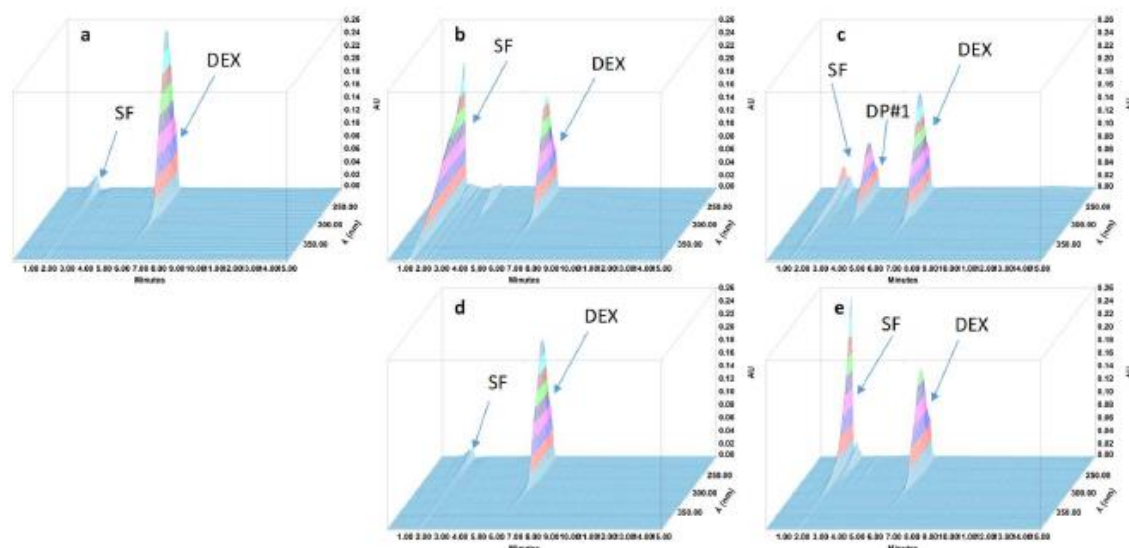
Regarding precision and trueness, acceptance criteria were met for the four analytical methods developed, since RSD of the mean concentrations were less than or equal to 4.4% and the percent recovery of QC concentrations was close to 100% of the expected value (Table 3). The LOQ in the suspensions was settled at 1.25 mg/mL for dexamethasone, phenytoin, and spironolactone and 1.20 mg/mL for hydrochlorothiazide. These results demonstrate that the analytical methods developed in this paper are accurate and allow reliable determination of dexamethasone, phenytoin, hydrochlorothiazide, or spironolactone content in oral liquid dosage forms compounded using Syrspend®SF PH4 Dry.

**Table 3.** Performance parameters obtained during accuracy assessment of the different analytical methods developed to perform dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, or spironolactone assay.

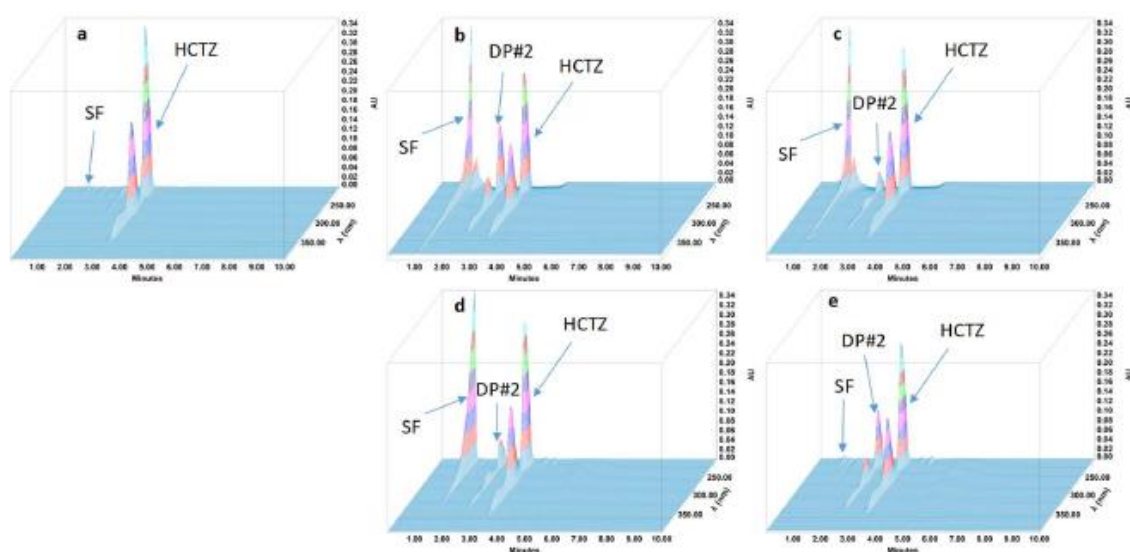
| Colonne1                     | Spironolactone                | Dexamethasone  | Hydrochlorothiazide | Phenytoin      |
|------------------------------|-------------------------------|----------------|---------------------|----------------|
| Target concentration (mg/mL) | 5.0                           | 5.0            | 2.0                 | 5.0            |
| Mean concentration (mg/mL)   | <i>Repeatability</i>          |                |                     |                |
|                              | 4.9                           | 5.0            | 2.0                 | 5.0            |
| RSD (%)                      | 4.4                           | 1.3            | 3.6                 | 4.0            |
| CI 95% (%)                   | [4.2 ; 4.7]                   | [1.3 ; 1.4]    | [3.5 ; 3.6]         | [1.9 ; 6.0]    |
| Mean concentration (mg/mL)   | <i>Intermediate precision</i> |                |                     |                |
|                              | 5.0                           | 4.9            | 2.0                 | 5.0            |
| RSD (%)                      | 3.0                           | 3.2            | 4.0                 | 3.1            |
| CI 95% (%)                   | [2.9 ; 3.1]                   | [3.1 ; 3.3]    | [3.9 ; 4.0]         | [2.3 ; 3.8]    |
| Recovery rate (%)            | <i>Trueness</i>               |                |                     |                |
|                              | 100.5                         | 98.8           | 99.8                | 99.7           |
| 95% CI (%)                   | [99.0 ; 102.0]                | [97.3 ; 100.4] | [97.8 ; 101.7]      | [98.2 ; 101.2] |

CI: confidence interval; RSD: relative standard deviation.

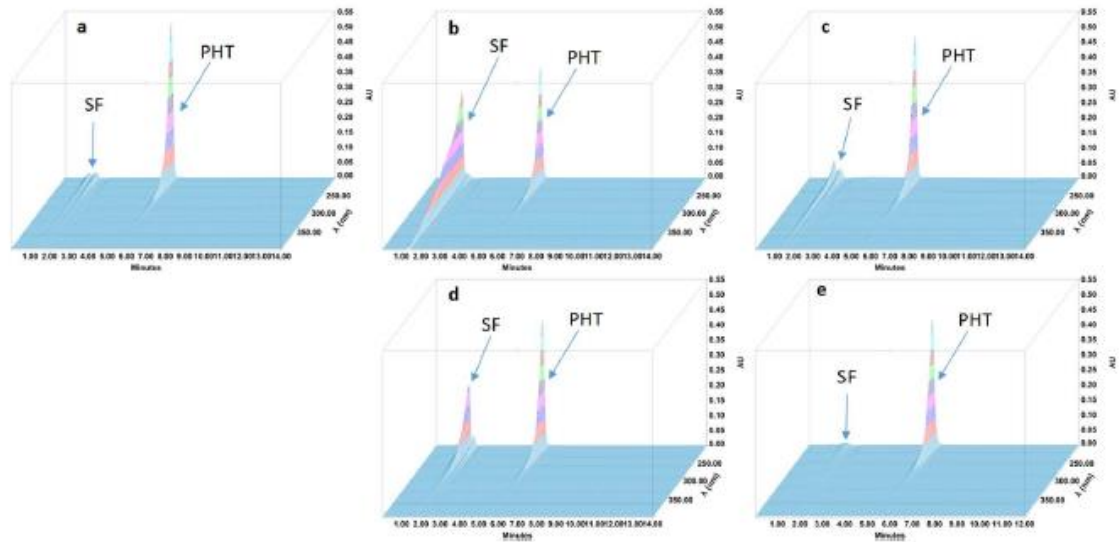
During the forced degradation study, several degradation products were formed (Figures 1–4) but none of them interfered with the API peaks in terms of retention time (resolution was always greater than 1.5) and according to UV spectrum analysis and purity check test of the peaks (Table 4). Given that all methods were linear and accurate and that no degradation products eluted with the API peak, these methods are stability-indicating according to international guidelines and can be used to determine targeted API content over time without interference by degradation products [27].



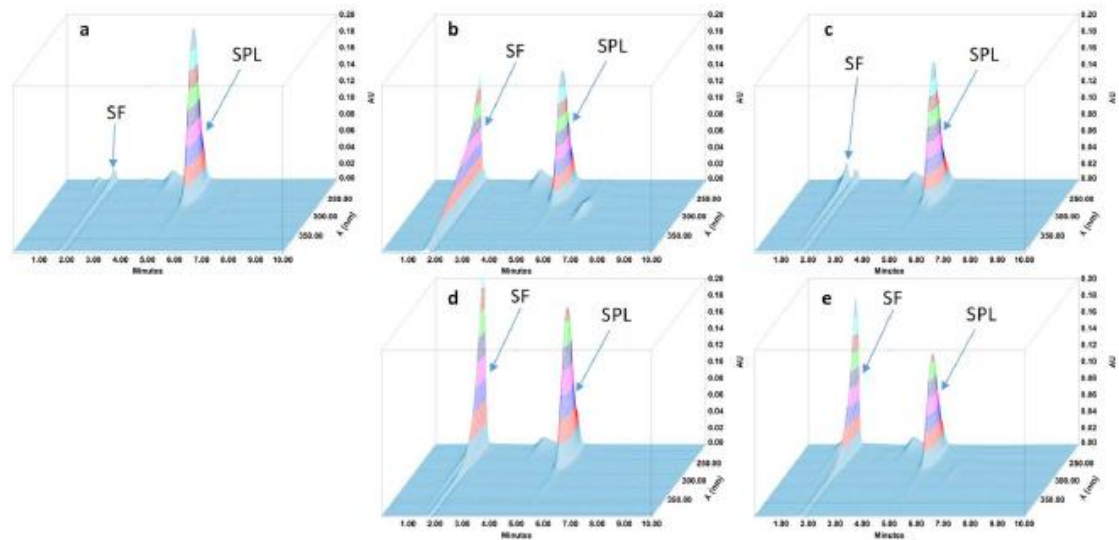
**Figure 1.** Three-dimensional chromatograms obtained for dexamethasone (DEX) oral suspensions after applying different stress conditions. (a) No stress; (b) HCl 0.5 M at 80 °C for 30 min; (c) NaOH 0.1 M at 80 °C for 10 min; (d) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% at 80 °C for 4 h; (e) 80 °C for 4 h. SF: solvent front; DP: degradation product.



**Figure 2.** Three-dimensional chromatograms obtained for hydrochlorothiazide (HCTZ) oral suspensions after applying different stress conditions. (a) No stress; (b) HCl 1 M at 80 °C for 1 h; (c) NaOH 1 M at 80 °C for 1 h; (d) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% at 80 °C for 4 h; (e) 80 °C for 4 h. SF: solvent front; DP: degradation product.



**Figure 3.** Three-dimensional chromatograms obtained for phenytoin (PHT) oral suspensions after applying different stress conditions. (a) No stress; (b) HCl 0.5 M at 80 °C for 4 h; (c) NaOH 1 M at 80 °C for 4 h; (d) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% at 80 °C for 4 h; (e) 80 °C for 4 h. SF: solvent front.



**Figure 4.** Three-dimensional chromatograms obtained for spironolactone (SPL) oral suspensions after applying different stress conditions. (a) No stress; (b) HCl 0.5 M at 80 °C for 1 h; (c) NaOH 0.1 M at 80 °C for 5 min; (d) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% at 80 °C for 4 h; (e) 80 °C for 4 h. SF: solvent front.

**Table 4.** Attributes related to three-dimensional chromatogram peaks obtained during a forced degradation study.

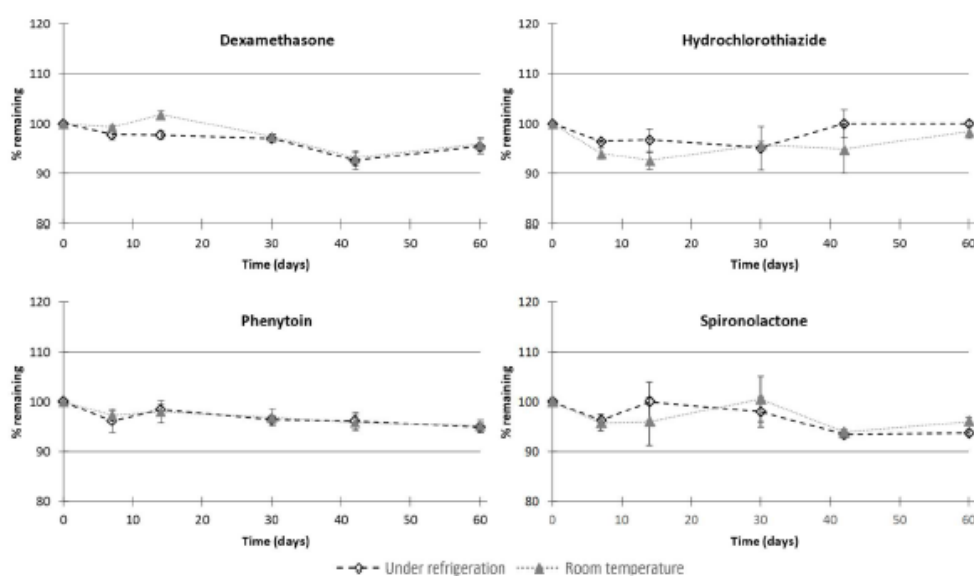
|  | Retention Time (min) | RRT  | Tailing Factor | Resolution | Theoretical Plates |
|--|----------------------|------|----------------|------------|--------------------|
| Dexamethasone                                  | 6.2                  | NA   | 1.03           | NA         | 6797               |
| Degradation product #1                         | 3.2                  | 0.52 | 1.12           | 12.74      | 6018               |
| Hydrochlorothiazide                            | 3.12                 | NA   | 1.16           | NA         | 5399               |
| Degradation product #2                         | 2.25                 | 0.72 | 1.18           | 6.06       | 5713               |
| Phénytoïne                                     | 5.44                 | NA   | 1.17           | NA         | 6240               |
| All degradation products were in solvent front |                      |      |                |            |                    |
| Spironolactone                                 | 5.23                 | NA   | 1.16           | NA         | 2547               |
| All degradation products were in solvent front |                      |      |                |            |                    |

NA: not applicable; RRT: relative retention time to the parent compound.

### 3.2. Feasibility and Stability Studies

Subsequent to the preparation, the mean concentrations of the compounded oral suspensions were equal to  $4.70 \pm 0.10$  mg/mL,  $2.0 \pm 0.04$  mg/mL,  $4.91 \pm 0.10$  mg/mL, and  $4.74 \pm 0.06$  mg/mL for dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, and spironolactone, respectively. Thereby, these results demonstrate that drug loss during preparation was minimal.

Regarding chemical stability, irrespective of the type of the storage condition used, no significant degradation of dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, or spironolactone occurred in the compounded oral suspensions (Figure 5). Indeed, during the period of testing, the proportion of the initial API concentration remaining was higher than 90%, meaning that oral suspensions were chemically stable up to 60 days under regular storage temperatures (at  $5 \pm 3$  °C or at  $22 \pm 4$  °C). In accordance with this result, no degradation products were observed over the assessed period. Moreover, for all samples, API concentration remained within 90 to 110% of the targeted strength, highlighting the fact that the dose content remained uniform over time for all the compounded suspensions.



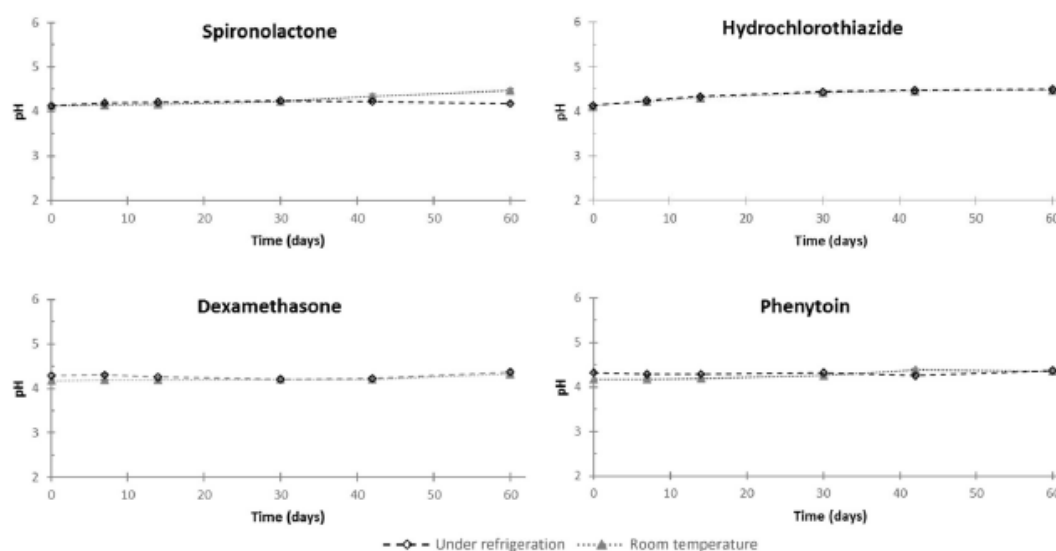
**Figure 5.** Chemical stability of dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, and spironolactone in compounded oral suspensions in all storage conditions. Values are expressed as mean percentage remaining  $\pm$  standard deviation.

According to the physical stability study, no color modification was observed, and no precipitates were retained over the storage period (Table 5). The pH of the oral suspensions remained stable over the testing period (less than 0.4 pH unit variation) (Figure 6), and no significant variation of osmolality occurred during the study (less than 100 mOsm/kg) (Table 5).

**Table 5.** Physical parameters assessed during the stability study of dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, and spironolactone oral suspensions regardless of the type of storage conditions used (under refrigeration or at room temperature).

|                     | Color                |                      | Precipitate<br>Day 60 | Osmolality (mOsm/kg) |        |
|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|--------|
|                     | Day 0                | Day 60               |                       | Day 0                | Day 60 |
| Dexamethasone       | white opalescent     | white opalescent     | no                    | <LOQ                 | <LOQ   |
| Hydrochlorothiazide | off-white opalescent | off-white opalescent | no                    | <LOQ                 | <LOQ   |
| Phenytoin           | white opalescent     | white opalescent     | no                    | <LOQ                 | <LOQ   |
| Spironolactone      | white opalescent     | white opalescent     | no                    | <LOQ                 | <LOQ   |

LOQ: limit of quantification (100 mOsm/kg).



**Figure 6.** pH modifications of dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, and spironolactone oral suspensions in all storage conditions. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (standard deviation bar charts are within symbols of the mean).

Overall, these results attest to the physical and chemical stability of the four oral liquid dosage forms over 60 days regardless of the type of storage conditions.

#### 4. Discussion

An HPLC-UV method was developed for each targeted API and validated according to well-recognized international guidelines. These stability-indicating methods are suitable to investigate the physicochemical stability of dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, or spironolactone in compounded preparations. Moreover, these methods, easy to implement and rapid to perform, may be routinely used for QC testing in order to perform a batch release of such compounded preparations.

To enable the appropriate volume of administration (preferably  $\leq 1$  mL for a newborn), according to the dose required in their therapeutic uses [6,8,28], we chose to prepare oral liquid dosage forms at a target concentration of 5 mg/mL for spironolactone, dexamethasone, and phenytoin and 2 mg/mL for hydrochlorothiazide. According to the literature, other authors have reported similar concentrations for oral liquid compounded preparations of the same APIs [10,13,15]. Some authors have proposed oral liquid dosage forms with lower strengths due to different therapeutic uses [12,14] or higher strengths since they were used in older children [9,11].

Dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, and spironolactone are hydrophobic compounds displaying poor solubility in water, and they are unsuitable for the preparation of solutions at the desired concentrations. Consequently, we had to compound suspensions in order to provide oral liquid dosage forms. One major disadvantage of the suspension dosage form is the risk of the settling of API particles producing non-homogeneous preparation leading to inaccuracy in dosage measurement. Thus, suspensions must be shaken before use in order to obtain re-dispersion of API and to avoid dosage variability during oral administration. However, according to the feasibility study, dose content uniformity of the suspensions was evidenced since the deviation of the concentration of the API in the compounded preparations was never higher than 8% of expected API strength. Thereby, these results demonstrate that the oral formulations compounded using Syrspend®SF PH4 Dry as a suspending vehicle provide a reliable dosage of the four APIs.

Moreover, the compounded liquid formulations display low osmolality ( $<100$  mOsm/kg) compared to several other formulations (around 1600 mOsm/kg) [9,10,12], ensuring safe oral administration in neonates. Indeed, high osmolality, greater than 450 mOsm/kg, may lead to necrotizing enterocolitis in neonates, especially in premature newborns [29].

Regardless of the type of storage conditions, the proportion of the initial concentration of dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, or spironolactone remaining was within the limit set by the U.S. Pharmacopeia [26], meaning that the oral suspensions of each drug compounded using Syrspend®SF PH4 Dry were stable up to 60 days both at room temperature or under refrigeration. This result is similar to or greater than the stability period reported by others [9–15]. The physicochemical stability of the four oral liquid dosage forms was investigated for a period of 60 days since the microbiological stability of suspensions compounded using Syrspend®SF PH4 Dry has been demonstrated by the manufacturer over the same period [30]. However, since the formulations do not contain any preservative, it is preferable to recommend storage under controlled refrigeration, in order to limit microbiological growth.

Young children and *a fortiori* neonates are uniquely vulnerable to PHE due to organ immaturity, specific pharmacokinetics, and since excipients may cause problems in the developing organism [31,32]. Several studies have demonstrated that neonates receive a significant number of potentially harmful pharmaceutical excipients, and therefore it is important to explore substitution possibilities [33,34]. To our knowledge, the study presented in this paper is the first to assess the feasibility of compounding dexamethasone, phenytoin, hydrochlorothiazide, and spironolactone oral suspensions using excipients free of potentially harmful effects.

Vehicles used to compound oral liquid medications of many APIs reported in the literature, including dexamethasone, phenytoin, hydrochlorothiazide, and spironolactone, contain potentially harmful excipients, especially preservatives. Indeed, since the liquid formulations present a risk of microbiological instability, preservatives are added to liquid compounded preparations. Among preservatives, parabens are the most widely used in drug formulation since they are considered safe, cheap, inert, and with no odor or taste [35]. Nevertheless, parabens are known to bind to estrogen receptors providing endocrine-disrupting properties [36]. Moreover, early life exposure to endocrine disrupting chemicals has been pointed out as a major concern regarding child health [37,38]. Given these elements, the EMA recommends to limit or even to avoid the use of parabens in medicine formulations, especially when intended for use in the pediatric population [22]. Once again, to our knowledge, the present study is the first to demonstrate the physicochemical stability of oral liquid

dosage forms containing the targeted API and compounded without preservatives, such as parabens. This result is of particular interest since the lack of preservatives may influence the chemical stability of a compound, especially due to their potential antioxidant activity [23].

In conclusion, the data provided in this study demonstrate that compounding oral liquid dosage forms free of potentially harmful excipient is workable, at least for the targeted active pharmaceutical ingredients: dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, and spironolactone. Moreover, the physicochemical stability of these oral liquid formulations is in accordance with common clinical use in children, including neonates. Even though the microbiological stability of oral suspensions compounded using Syrspend®SF PH4 Dry has been assessed by the manufacturer, further experiments should be performed in order to assess the in-use microbiological stability of the preparations compounded with dexamethasone, hydrochlorothiazide, phenytoin, or spironolactone.

Finally, use of the proposed oral suspensions provides a reliable solution to reduce the exposure of children, especially newborns, to potentially harmful excipients, including potentially endocrine-disrupting excipients, such as parabens.

**Author Contributions:** G.B.: Methodology, Investigation, Visualization, Writing- Original draft. K.B.: Conceptualization, Validation. V.M.: Writing- Original draft, Supervision. L.M.: Investigation. B.T.: Investigation. N.V.: Validation, Writing- Reviewing and Editing. A.D.: Conceptualization, Methodology, Writing- Reviewing and Editing, Supervision.

**Funding:** This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors and was supported by internal funding.

**Acknowledgments:** We wish to thank Jeffrey Arsham for his highly helpful reading of our original text.

**Conflicts of Interest:** The authors report no conflict of interest.

## References

- Nahata, M.C. Lack of Pediatric Drug Formulations. *Pediatrics* **1999**, *104*, 607–609.
- Mistry, P.; Batchelor, H. SPaeDD-UK project (Smart Paediatric Drug Development—UK) Evidence of acceptability of oral paediatric medicines: A review. *J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, *69*, 361–376. [CrossRef]
- Conroy, S.; Choonara, I.; Impicciatore, P.; Mohn, A.; Arnell, H.; Rane, A.; Knoepfel, C.; Seyberth, H.; Pandolfini, C.; Raffaelli, M.P.; et al. Survey of unlicensed and off label drug use in paediatric wards in European countries. European Network for Drug Investigation in Children. *BMJ* **2000**, *320*, 79–82. [CrossRef]
- European Medicines Agency. Reflection Paper: Formulation of Choice for the Paediatric Population. 2006. Available online: [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/reflection-paper-formulations-choice-paediatric-population\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/reflection-paper-formulations-choice-paediatric-population_en.pdf) (accessed on 14 March 2019).
- Richey, R.H.; Shah, U.U.; Peak, M.; Craig, J.V.; Ford, J.L.; Barker, C.E.; Nunn, A.J.; Turner, M.A. Manipulation of drugs to achieve the required dose is intrinsic to paediatric practice but is not supported by guidelines or evidence. *BMC Pediatr.* **2013**, *13*, 81. [CrossRef] [PubMed]
- Donovan, M.D.; Griffin, B.T.; Kharoshankaya, L.; Cryan, J.F.; Boylan, G.B. Pharmacotherapy for Neonatal Seizures: Current Knowledge and Future Perspectives. *Drugs* **2016**, *76*, 647–661. [CrossRef] [PubMed]
- Mitchell, C.D.; Richards, S.M.; Kinsey, S.E.; Lilleyman, J.; Vora, A.; Eden, T.O.B. Medical Research Council Childhood Leukaemia Working Party Benefit of dexamethasone compared with prednisolone for childhood acute lymphoblastic leukaemia: Results of the UK Medical Research Council ALL97 randomized trial. *Br. J. Haematol.* **2005**, *129*, 734–745. [CrossRef] [PubMed]
- Segar, J.L. Neonatal Diuretic Therapy: Furosemide, Thiazides, and Spironolactone. *Clin. Perinatol.* **2012**, *39*, 209–220. [CrossRef] [PubMed]
- Allen, L.V.; Erickson, M.A. Stability of ketoconazole, metolazone, metronidazole, procainamide hydrochloride, and spironolactone in extemporaneously compounded oral liquids. *Am. J. Health-Syst. Pharm. AJHP Off. J. Am. Soc. Health-Syst. Pharm.* **1996**, *53*, 2073–2078. [CrossRef] [PubMed]
- Binson, G.; Venisse, N.; Bacle, A.; Beuzit, K.; Dupuis, A. Preparation and Physico-Chemical Stability of Dexamethasone Oral Suspension. *Pharm. Technol. Hosp. Pharm.* **2017**, *2*, 193–201. [CrossRef]



11. Ferreira, A.O.; Polonini, H.C.; Silva, S.L.; Patrício, F.B.; Brandão, M.A.F.; Raposo, N.R.B. Feasibility of amlodipine besylate, chloroquine phosphate, dapsone, phenytoin, pyridoxine hydrochloride, sulfadiazine, sulfasalazine, tetracycline hydrochloride, trimethoprim and zonisamide in SyrSpend®SF PH4 oral suspensions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *118*, 105–112. [CrossRef] [PubMed]
12. Glass, B.D.; Haywood, A. Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2006**, *9*, 398–426.
13. Mendes, C.; Costa, A.P.; Oliveira, P.R.; Tagliari, M.P.; Silva, M.A.S. Physicochemical and microbiological stability studies of extemporaneous antihypertensive pediatric suspensions for hospital use. *Pharm. Dev. Technol.* **2013**, *18*, 813–820. [CrossRef]
14. Polonini, H.C.; Loures, S.; Lima, L.C.; Ferreira, A.O.; Brandão, M.A.F. Stability of Atenolol, Clonazepam, Dexamethasone, Diclofenac Sodium, Diltiazem, Enalapril Maleate, Ketoprofen, Lamotrigine, Penicillamine-D, and Thiamine in SyrSpend SF PH4 Oral Suspensions. *Int. J. Pharm. Compd.* **2016**, *20*, 167–174.
15. Polonini, H.C.; Silva, S.L.; de Almeida, T.R.; Brandão, M.A.F.; Ferreira, A.O. Compatibility of caffeine, carvedilol, clomipramine hydrochloride, folic acid, hydrochlorothiazide, loperamide hydrochloride, methotrexate, nadolol, naltrexone hydrochloride and pentoxifylline in SyrSpend SF PH4 oral suspensions. *Eur. J. Hosp. Pharm.* **2016**, *23*, 352–358. [CrossRef]
16. Fabiano, V.; Marni, C.; Zuccotti, G.V. Paediatric pharmacology: Remember the excipients. *Pharmacol. Res.* **2011**, *63*, 362–365. [CrossRef]
17. Golightly, L.K.; Smolinske, S.S.; Bennett, M.L.; Sutherland, E.W.; Rumack, B.H. Pharmaceutical excipients. Adverse effects associated with inactive ingredients in drug products (Part I). *Med. Toxicol. Advers. Drug Exp.* **1988**, *3*, 128–165.
18. European Medicines Agency. Questions and Answers on Benzoic Acid and Benzoates Used as Excipients in Medicinal Products for Human Use. 2017. Available online: [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/questions-answers-benzoic-acid-benzoates-used-excipients-medicinal-products-human-use\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/questions-answers-benzoic-acid-benzoates-used-excipients-medicinal-products-human-use_en.pdf) (accessed on 14 March 2019).
19. Nowak, K.; Ratajczak-Wrona, W.; Górska, M.; Jabłońska, E. Parabens and their effects on the endocrine system. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2018**, *474*, 238–251. [CrossRef]
20. Barouki, R.; Gluckman, P.D.; Grandjean, P.; Hanson, M.; Heindel, J.J. Developmental origins of non-communicable disease: Implications for research and public health. *Environ. Health* **2012**, *11*, 42. [CrossRef]
21. Bergman, Å.; Heindel, J.; Jobling, S.; Kidd, K.; Zoeller, R.T. State of the science of endocrine disrupting chemicals. *Toxicol. Lett.* **2012**, *211S*, S3. [CrossRef]
22. European Medicines Agency. Reflection Paper on the Use of Methyl- and Propylparaben as Excipients in Human Medicinal Products for Oral Use. 2013. Available online: [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/reflection-paper-use-methyl-propylparaben-excipients-human-medicinal-products-oral-use\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/reflection-paper-use-methyl-propylparaben-excipients-human-medicinal-products-oral-use_en.pdf) (accessed on 14 March 2019).
23. Korotkova, E.L.; Avramchik, O.A.; Angelov, T.M.; Karbainov, Y.A. Investigation of antioxidant activity and lipophilicity parameters of some preservatives. *Electrochim. Acta* **2005**, *51*, 324–332. [CrossRef]
24. Yalkowsky, S.H.; He, Y.; Jain, P. Handbook of Aqueous Solubility Data. 2010. Available online: <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Aqueous-Solubility-Data/Yalkowsky-He-Jain/p/book/9781439802458> (accessed on 14 March 2019).
25. Roulet, L.; Maillard, N.; Dupuis, A. Bonnes pratiques de préparations: Le projet de l’Afssaps. *Actual. Pharm. Hosp.* **2007**, *3*, 39–43. [CrossRef]
26. Allen, L.V., Jr.; Bassani, G.S.; Elder, E.J.; Parr, A.F. Strength and Stability Testing for Compounded Preparations. US Pharmacop. 2014, pp. 1–7. Available online: <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/FAQs/strength-stability-testing-compounded-preparations.pdf> (accessed on 14 March 2019).
27. Abraham, J. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals for Human Use. In *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*; Brouder, A., Tietje, C., Eds.; Brill: Leiden, The Netherlands, 2009; pp. 1041–1054. ISBN 978-90-04-16330-0.
28. Larsen, E.C.; Devidas, M.; Chen, S.; Salzer, W.L.; Raetz, E.A.; Loh, M.L.; Mattano, L.A.; Cole, C.; Eicher, A.; Haugan, M.; et al. Dexamethasone and High-Dose Methotrexate Improve Outcome for Children and Young Adults with High-Risk B-Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report from Children’s Oncology Group Study AALL0232. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 2380–2388. [CrossRef]

29. Mutz, A.E.; Obladen, M.W. Hyperosmolar oral medication and necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* **1985**, *75*, 371–372.
30. SyrSpend®SF PH4 Dry | Fagron. Available online: <https://fagron.com/en/product/syrspend-rs-sf-ph4-dry> (accessed on 14 March 2019).
31. European Medicines Agency. Guideline on the Investigation of Medicinal Products in the Term and Preterm Neonate. 2009. Available online: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003754.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003754.pdf) (accessed on 14 March 2019).
32. Warner, A. Drug use in the neonate: Interrelationships of pharmacokinetics, toxicity, and biochemical maturity. *Clin. Chem.* **1986**, *32*, 721–727.
33. Nellis, G.; Metsvaht, T.; Varendi, H.; Lass, J.; Duncan, J.; Nunn, A.J.; Turner, M.A.; Lutsar, I. Product Substitution as a Way Forward in Avoiding Potentially Harmful Excipients in Neonates. *Pediatr. Drugs* **2016**, *18*, 221–230. [CrossRef]
34. Nellis, G.; Metsvaht, T.; Varendi, H.; Toompere, K.; Lass, J.; Meseck, I.; Nunn, A.J.; Turner, M.A.; Lutsar, I. Potentially harmful excipients in neonatal medicines: A pan-European observational study. *Arch. Dis. Child.* **2015**, *100*, 694–699. [CrossRef]
35. Soni, M.G.; Carabin, I.G.; Burdock, G.A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 985–1015. [CrossRef]
36. Karpuzoglu, E.; Holladay, S.D.; Gogal, R.M. Parabens: Potential impact of low-affinity estrogen receptor binding chemicals on human health. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **2013**, *16*, 321–335. [CrossRef]
37. Skakkebaek, N.E.; Toppari, J.; Söder, O.; Gordon, C.M.; Dival, S.; Draznin, M. The Exposure of Fetuses and Children to Endocrine Disrupting Chemicals: A European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) and Pediatric Endocrine Society (PES) Call to Action Statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 3056–3058. [CrossRef]
38. WHO | Endocrine Disruptors and Child Health. Available online: [http://www.who.int/ceh/publications/endocrine\\_disruptors\\_child/en/](http://www.who.int/ceh/publications/endocrine_disruptors_child/en/) (accessed on 14 March 2019).



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**ANNEXE 3 : POSTER PRESENTE AU CONGRES SNPHEU 2020**

## EXPOSITION DES NOUVEAU-NES PREMATURES AUX PARABENS VIA LES MEDICAMENTS, UNE ETUDE PROSPECTIVE MULTICENTRIQUE

G. Binson<sup>1</sup>, B. Gouyon<sup>2</sup>, J.-B. Gouyon<sup>2</sup>, K. Beuzit<sup>3</sup>, N. Venisse<sup>1</sup>, A. Dupuis<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CIC INSERM 1402 « HEDEX », CHU de Poitiers, 2 rue de la milétrie, 86021 Poitiers

<sup>2</sup> Centre d'Etudes Périnatales de l'Océan Indien (EA 7388), CHU de La Réunion – Site sud, Saint Pierre

<sup>3</sup> Pharmacie, CHU de Poitiers, 2 rue de la milétrie, 86021 Poitiers

### INTRODUCTION

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont suspectés d'être à l'origine de l'augmentation de l'incidence de certaines maladies chroniques (hypothèse DOHAD). Dans cette hypothèse, l'exposition aux PE durant la période prénatale et les premières phases de la vie aurait des conséquences sur la santé à long terme (développement de cancers, obésité, maladies métaboliques...). Les parabènes, utilisés depuis près d'un siècle comme conservateurs dans les aliments, les cosmétiques et les médicaments, ont été identifiés comme PE. Or, les nouveau-nés prématurés sont très susceptibles de recevoir des médicaments et donc d'être exposés à ces PE. L'objectif de notre étude est d'étudier à grande échelle cette exposition aux parabènes chez les nouveau-nés prématurés via l'administration des médicaments.

### MATERIELS & METHODES

Une étude prospective multicentrique a été mise en place au niveau national. Les critères d'inclusion étaient : nouveau-nés hospitalisé à la naissance, hospitalisation en réanimation pédiatrique, naissance dans le centre d'inclusion, au moins une prescription de médicaments. La période d'inclusion s'est étendue sur une durée de 6 mois et chaque enfant inclus a été suivi pendant une durée de 28 jours. Le recueil des médicaments prescrits a été effectué à l'aide du logiciel Logipren®. Pour chaque enfant, les éléments suivants ont été recueillis : âge gestationnel à la naissance, poids de naissance, prescriptions, poids à la prescription.

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### Caractéristiques démographiques

Plus de 8000 nouveau-nés ont été inclus dans l'étude pour 35 centres d'inclusion. Les caractéristiques démographiques de la population sont présentées dans le Tableau 1

Tableau 1: Caractéristiques démographiques de la population d'étude

| Caractère  |                  |              |             |
|--|------------------|--------------|-------------|
| Nombre de patients inclus                            |                  | 8078         |             |
| Dont filles  |                  | 3727 (46,1%) |             |
| Dont garçons   |                  | 4351 (53,9%) |             |
| Répartition par âge gestationnel à la naissance (SA) |                  |              |             |
|  | N                | Filles (%)   | Garçons (%) |
| ≥ 37   | 3644             | 44,3         | 55,7        |
| 32-36  | 2995             | 47,3         | 52,7        |
| 28-32  | 966              | 46,7         | 53,3        |
| <28  | 473              | 51,8         | 48,2        |
| Poids moyen à la naissance (g)                       |                  |              |             |
|  | Moyenne ± EC (g) |              |             |
| ≥ 37   | 3177,92 ± 610,91 |              |             |
| 32-36  | 2154,35 ± 492,71 |              |             |
| 28-32  | 1330,66 ± 315,59 |              |             |
| <28  | 811,46 ± 179,43  |              |             |

Concernant le méthylparabène, les nouveau-nés à terme et les très grands prématurés (<28SA) sont les plus exposés tandis que les prématurés et les grands prématurés sont les moins exposés. Les tests de Wilcoxon montrent des différences significatives entre chacun des groupes. Le test de Kruskal-Wallis sur l'ensemble des groupes montrent également une différence significative ( $p < 0,01$ ).

Pour l'éthylparabène, l'exposition augmentait en fonction de l'âge gestationnel à la naissance. Ici, aussi le test de Kruskal-Wallis montrait une différence significative ( $p < 0,01$ ).

Pour le propylparabène, l'exposition est plus homogène mais montre tout de même une augmentation de l'exposition pour les plus jeunes âges gestationnels (Kruskal-Wallis,  $p < 0,01$ ).

Concernant l'analyse par poids de naissance, aucune différence significative n'est retrouvée pour le méthylparabène, au contraire de l'éthyl- et du propylparabène. Pour l'éthylparabène, l'exposition est beaucoup plus importante chez les nouveau-nés de plus de 1000g. L'inverse est constatée pour le propylparabène.

Les moyennes d'exposition (Tableau 4) sont semblables à cette retrouvées dans la littérature (2, 3)

Tableau 4: Exposition moyenne aux parabènes via l'administration des médicaments ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ )

|               | MePb        | EtPb        | PrPb        |
|---------------|-------------|-------------|-------------|
| all patient   | 0,374±0,748 | 0,058±0,164 | 0,055±0,113 |
| ≥ 37 SA       | 0,376±0,722 | 0,086±0,214 | 0,049±0,103 |
| all premature | 0,373±0,769 | 0,034±0,100 | 0,059±0,121 |
| 32-36         | 0,293±0,656 | 0,038±0,113 | 0,044±0,101 |
| 28-32         | 0,490±0,919 | 0,026±0,065 | 0,084±0,146 |
| <28           | 0,643±0,961 | 0,028±0,067 | 0,105±0,156 |

#### Médicaments contenant des parabènes

Comme pour notre étude préliminaire (1), 393 spécialités pharmaceutiques ont été identifiées comme contenant au moins un des 4 parabènes recherchés, dont près de 74% avaient une galénique destinées à la voie orale (Tableau 2).

Quasiment l'ensemble des spécialités recensées contenaient du méthylparabène. Le butylparabène étant le composé le moins retrouvé (Tableau 3). Seulement 30 spécialités (26 DCI) ont été retrouvées dans les prescriptions.

Tableau 3: Répartition des parabènes dans les spécialités pharmaceutiques

|                | Nombre de médicaments concernés | Proportion (%) |
|----------------|---------------------------------|----------------|
| Méthylparabène | 361                             | 91,8           |
| Ethylparabène  | 19                              | 4,8            |
| Propylparabène | 275                             | 70,0           |
| Butylparabène  | 4                               | 1,0            |

Tableau 2: Proportion des formes galéniques dans les spécialités recensées

| Voie d'administration | Proportion (%) |
|-----------------------|----------------|
| Orale                 | 73,8           |
| Formes solides        | 18,1           |
| Formes liquides       | 76,9           |
| Formes semi-solides   | 5,0            |
| Injectable            | 4,7            |
| Externe               | 16,8           |
| Autres                | 4,7            |

Figure 1: Doses journalières moyenne d'exposition ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en fonction de l'âge gestationnel du méthylparabène (A), éthylparabène (B) et propylparabène (C)

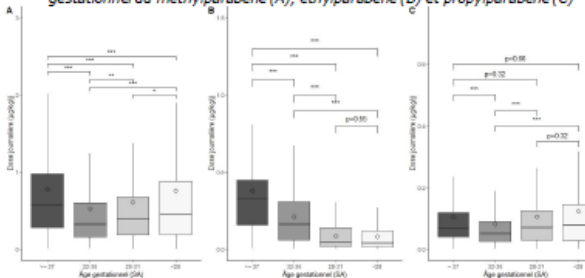
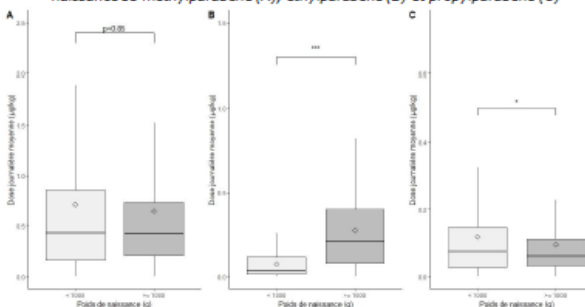


Figure 2: Doses journalières moyenne d'exposition ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en fonction du poids de naissance du méthylparabène (A), éthylparabène (B) et propylparabène (C)



### CONCLUSION

Cette étude est la première à étudier de façon prospective et multicentrique l'exposition des nouveau-nés aux parabènes via l'administration des médicaments. Elle démontre que ces produits de santé sont des sources majeures d'exposition à ces composés et que l'âge gestationnel est un critère déterminant de cette exposition. Le faible nombre de médicaments impliqués devrait inciter les autorités de tutelle et les industriels à agir pour évincer les parabènes des formulations galéniques, ainsi que les praticiens et les pharmaciens à changer leurs pratiques.

#### Littérature

- Binson et al. Exposition des nouveau-nés aux parabènes via les médicaments administrés durant leur hospitalisation. *Ann Pharm Fr* 2020 Jul;78(4):343-350.
- Mulla et al. An Observational Study of Blood Concentrations and Kinetics of Methyl- and Propyl-Parabens in Neonates. *Pharm Res* 32, 1084-1093 (2015)
- Yakkundi et al. Quantitative analysis of methyl and propyl parabens in neonatal DBS using LC-MS/MS. *Bioanalysis*. 2016 Jun;8(11):1173-82.

Remerciements: M. Simon Lorrain pour son aide sur la base de données issue de Logipren.



**ANNEXE 4 : COMMUNICATION ORALE AU CONGRES SNPHPU 2020**

# EXPOSITION DES NOUVEAU-NES PREMATURES AUX PARABENES VIA LES MEDICAMENTS, UNE ETUDE PROSPECTIVE MULTICENTRIQUE

G. BINSON<sup>1</sup>, B. GOUYON<sup>2</sup>, J.-B. GOUYON<sup>2</sup>, K. BEUZIT<sup>3</sup>, N. VENISSE<sup>1</sup>, A. DUPUIS<sup>1</sup>

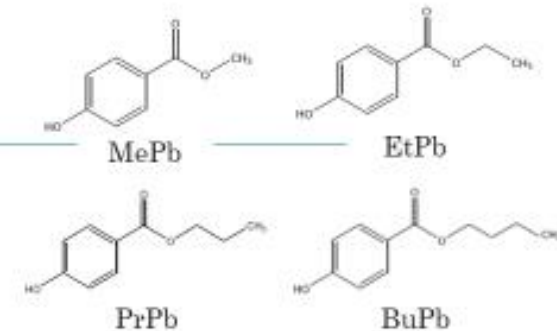
<sup>1</sup> CIC INSERM 1402 « HEDEX », CHU DE POITIERS, 2 RUE DE LA MILÉTRIE, 86021 POITIERS

<sup>2</sup> CENTRE D'ETUDES PÉRINATALES DE L'OcéAN INDIEN (EA 7388), CHU DE LA RÉUNION – SITE SUD, SAINT PIERRE

<sup>3</sup> PHARMACIE, CHU DE POITIERS, 2 RUE DE LA MILÉTRIE, 86021 POITIERS

## Contexte

- Parabènes = esters de l'acide parahydroxybenzoïque
  - Méthyl-, éthyl-, propyl- et butylparabène
- Conservateurs
  - Alimentation, cosmétiques et médicaments
- Effets perturbateurs endocriniens : MePb < EtPb < PrPb < BuPb
- DOHAD hypothesis: effets de l'exposition pré- et périnatale



Developmental origins of non-communicable disease: Implications for research and public health

Robert Barouki<sup>1\*</sup>, Peter D. Gluckman<sup>2</sup>, Philippe Grandjean<sup>3,4</sup>, Mark Hanson<sup>5</sup> and Jerrold J. Hendel<sup>6</sup>

Parabens and their effects on the endocrine system

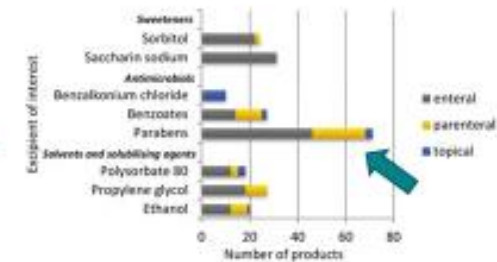
Karolina Nowak<sup>a,\*</sup>, Wioletta Ratajczak-Wrona<sup>a</sup>, Maria Górska<sup>b</sup>, Ewa Jabłońska<sup>a</sup>

**Association of phthalates, parabens and phenols found in personal care products with pubertal timing in girls and boys**

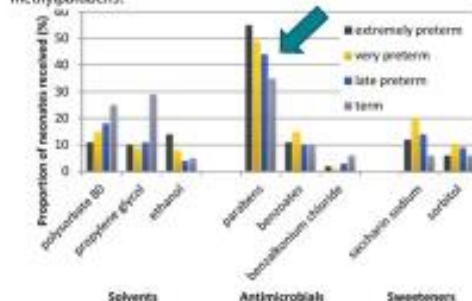
Kim G. Harley<sup>1,\*</sup>, Kimberly P. Berger<sup>1</sup>, Katherine Kogut<sup>1</sup>, Kimberly Parra<sup>1</sup>, Robert H. Lustig<sup>2</sup>, Louise C. Greenspan<sup>3</sup>, Antonia M. Calafat<sup>4</sup>, Xiaoyun Ye<sup>4</sup>, and Brenda Eskenazi<sup>1</sup>

## Contexte

- Etudes sur l'exposition des nouveau-nés aux parabènes
  - Peu nombreuses
  - Faible nombre d'individus
  - Pas de reflet de la variabilité des prises en charge
  - Pas de quantification de l'exposition
  
- Prescription fréquente de médicaments contenant des parabènes
  - Nouveau-nés exposés au moins une fois : 35-55%
  - Concentrations plasmatiques + importantes vs adultes (2)



**Figure 1** Excipients of interest in prescribed medicines by route of administration. Benzoates include benzyl alcohol, sodium benzoate and benzoic acid; parabens include propylparabens, ethylparabens and methylparabens.



**Figure 2** Proportion of neonates receiving specified excipient by gestational age (GA) category. Extremely preterm, very preterm, late preterm and term denote GA categories of <28, 28 to <32, 32 to <37 and >37 weeks, respectively; benzoates include benzyl alcohol, sodium benzoate and benzoic acid; parabens include propylparabens, ethylparabens and methylparabens.

(1) Nellis G, Metsvaht T, Varendi H on behalf of the ESNEE consortium, et al Potentially harmful excipients in neonatal medicines: a pan-European observational study. *Archives of Disease in Childhood* 2015;100:694-699.

(2) Mulla, H., Yakkundi, S., McElroy, J. et al. An Observational Study of Blood Concentrations and Kinetics of Methyl- and Propyl-Parabens in Neonates. *Pharm Res* 32, 1084-1093 (2015)



# Objectifs

---

- Identifier les traitements médicaments contenant des parabènes prescrits chez les nouveau-nés
  
- Quantifier l'exposition aux parabènes des nouveau-nés via l'administration des médicaments

# Matériel et méthodes

---

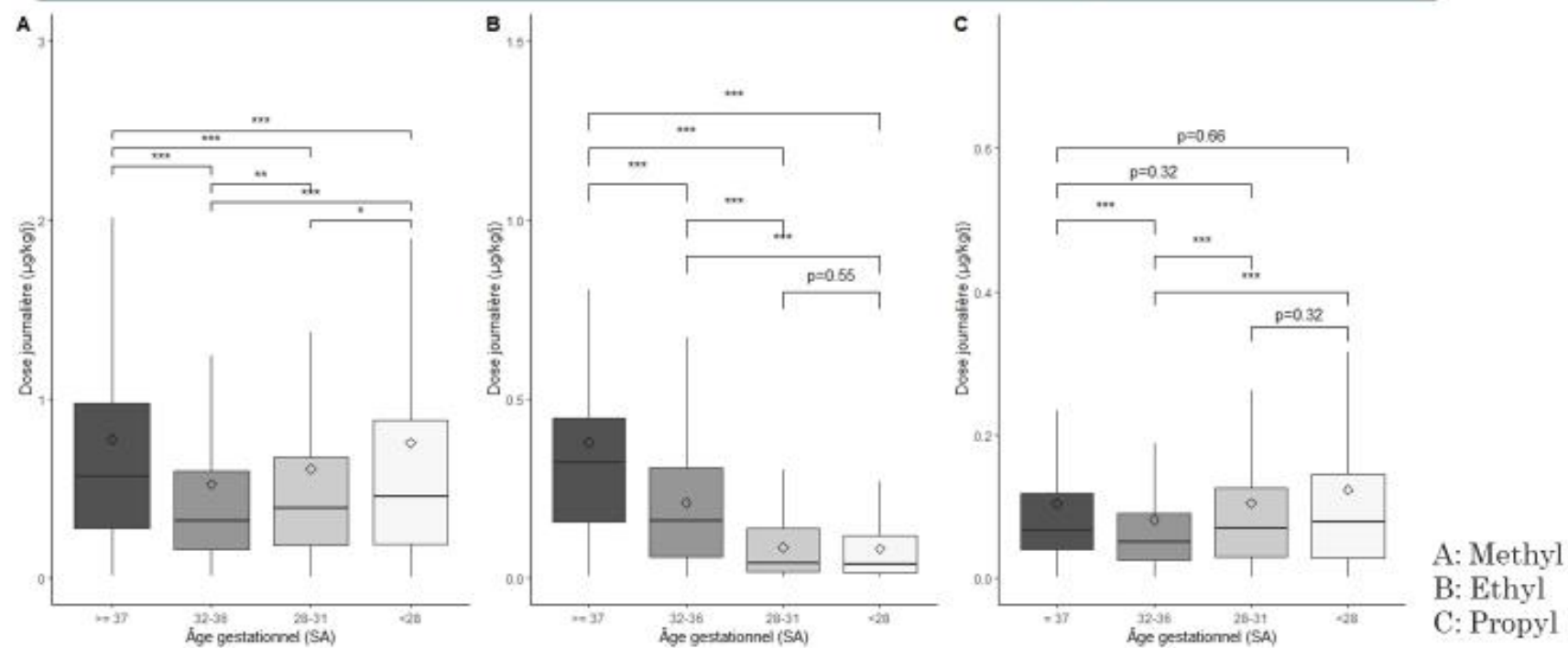
- Etude prospective sur 6 mois
- 36 centres d'inclusion (CHU, CHG)
- Recueil des prescriptions via le logiciel Logipren®
- Analyse :
  - Âge gestationnel à la naissance
    - $\geq 37$  SA
    - 32-36 SA
    - 28-31 SA
    - $< 28$  SA
  - Poids de naissance :
    - $\geq 1000$  g
    - $< 1000$  g

# Résultats

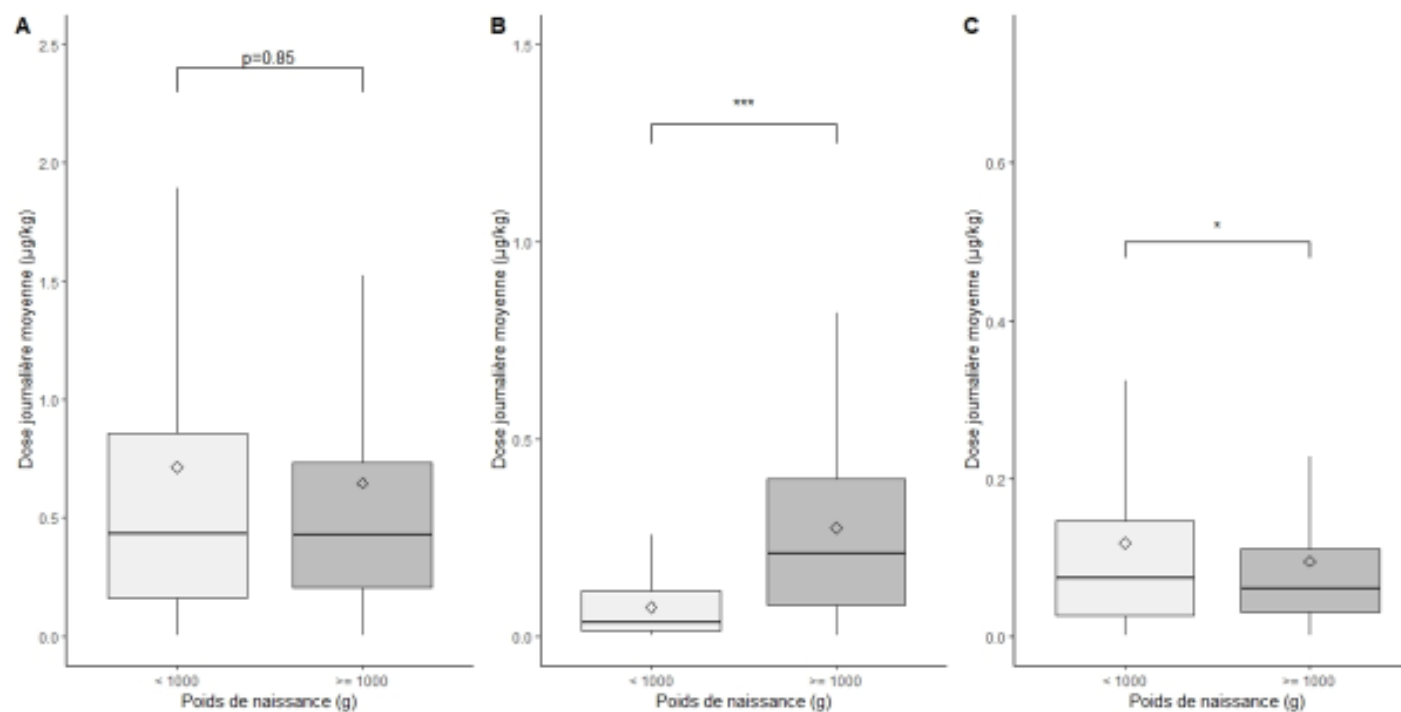
## ■ Caractéristiques démographiques de la population d'étude

| <b>Caractère</b>  |          |                      |                    |
|---|----------|----------------------|--------------------|
| <b>Nombre de patients inclus</b>                            |          | 8078                 |                    |
| <b>Dont filles</b>  |          | 3727 (46,1%)         |                    |
| <b>Dont garçons</b>   |          | 4351 (53,9%)         |                    |
| <b>Répartition par âge gestationnel à la naissance (SA)</b> | <b>N</b> | <b>Filles (%)</b>    | <b>Garçons (%)</b> |
| ≥ 37  | 3644     | 44,3                 | 55,7               |
| 32-36   | 2995     | 47,3                 | 52,7               |
| 28-32   | 966      | 46,7                 | 53,3               |
| <28   | 473      | 51,8                 | 48,2               |
| <b>Poids moyen à la naissance (g)</b>                       |          | <b>Mean ± sd (g)</b> |                    |
| ≥ 37  |          | 3177,92 ± 610,91     |                    |
| 32-36   |          | 2154,35 ± 492,71     |                    |
| 28-32   |          | 1330,66 ± 315,59     |                    |
| <28   |          | 811,46 ± 179,43      |                    |

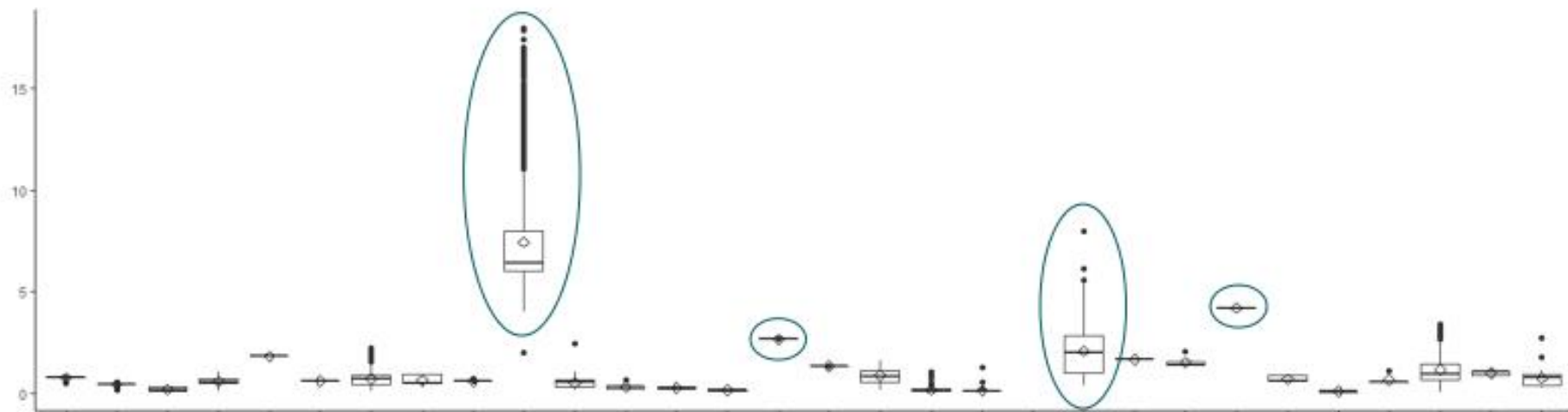
## Résultats: Exposition en fonction de l'âge gestationnel



## Résultats: Exposition en fonction du poids de naissance



## Résultats: Doses apportées par les médicaments (MePb)

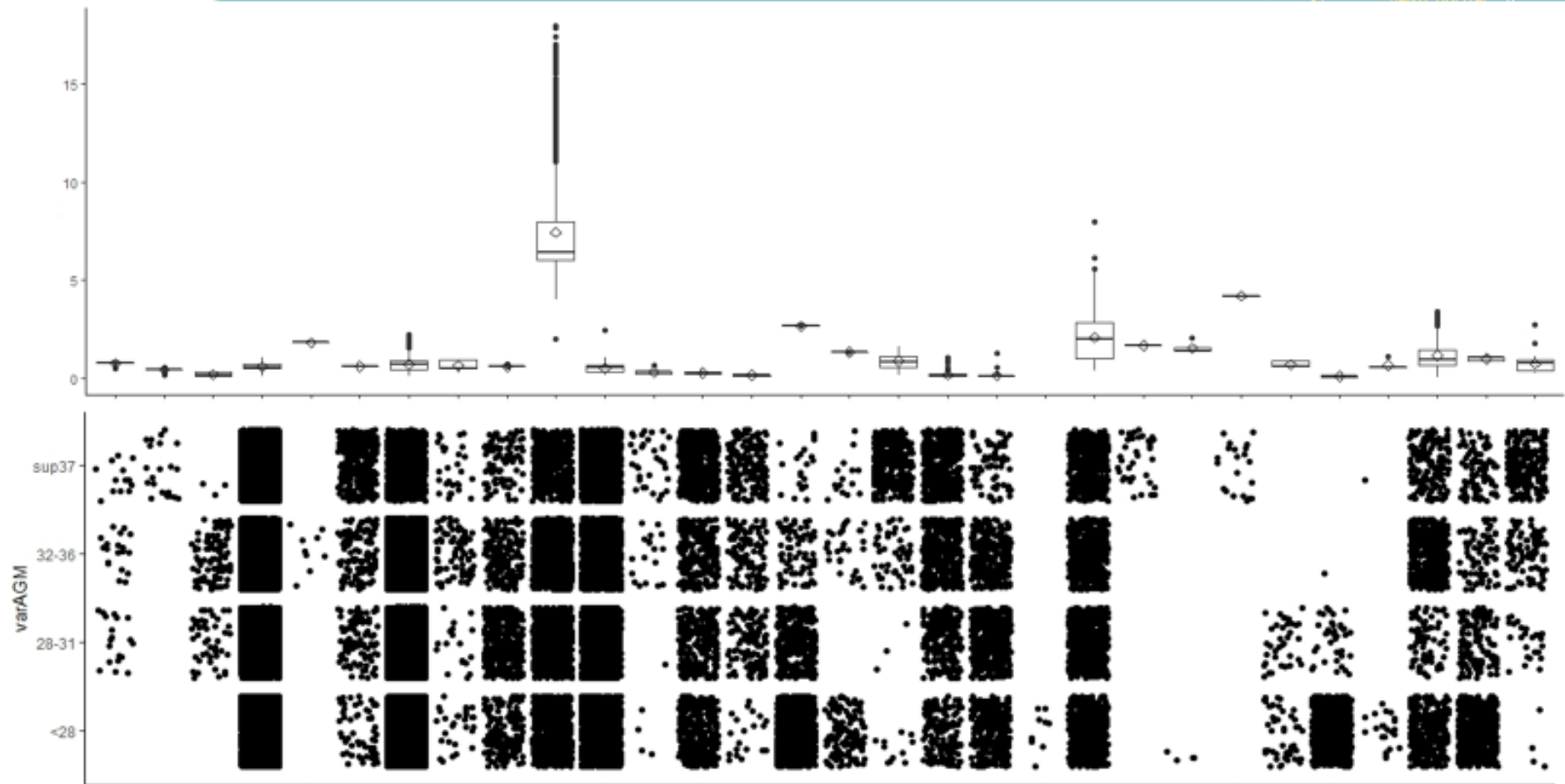


## Conclusion

---

- Exposition des nouveau-nés à 3 parabènes
- Variations significatives selon l'âge gestationnel
- Variations importantes des doses d'exposition
- Faible nombre de médicaments → effort des industriels ?
- Part des médicaments vis-à-vis des autres sources d'exposition ?







## RESUME DE LA THESE

Les parabènes, reconnus comme perturbateurs endocriniens, sont couramment utilisés en tant que conservateurs dans l'alimentation et les cosmétiques mais également dans les médicaments. Selon l'hypothèse de la DOHAD (Developmental Origins of Health And Diseases), l'exposition pré- et périnatale à ces composés est un facteur de risque de développer des maladies chroniques plus tard dans la vie. Les nouveau-nés, et plus particulièrement les prématurés, constituent une population particulièrement vulnérable à ces substances du fait de l'immaturation de leur métabolisme et de la poursuite du développement à cette période de vie, notamment concernant leur système endocrinien. Néanmoins, l'exposition des nouveau-nés aux parabènes n'a été que très peu étudiée, en particulier l'exposition à travers l'administration des médicaments.

L'objectif de cette thèse est d'étudier l'exposition des nouveau-nés aux parabènes via l'administration des médicaments. Pour cela, nos travaux ont consisté à : (i) Identifier les médicaments utilisés en pédiatrie contenant des parabènes et estimer l'exposition aux parabènes à l'aide d'une cohorte de plus de 8000 nouveau-nés hospitalisés dans les établissements de santé français ; (ii) Mettre au point une méthode de dosage sanguin ultrasensible des parabènes, adaptée à cette population afin d'évaluer la part attribuable aux médicaments dans l'exposition aux parabènes ; et (iii) Proposer des stratégies alternatives permettant de limiter cette exposition dans la prise en charge de ces nouveau-nés.

Nos résultats montrent une exposition significative des nouveau-nés, qu'ils soient prématurés ou nés à terme, à trois parabènes. Plus de 50% des nouveau-nés ont été exposés au moins une fois au méthyle et au propylparabène, cette fréquence d'exposition diminue avec l'âge gestationnel à la naissance. Cette tendance a été également retrouvée également pour l'éthylparabène. Les valeurs moyennes d'exposition étaient de  $0,654 \pm 0,892$ ,  $0,256 \pm 0,261$  et  $0,097 \pm 0,136$  mg/kg/j pour le méthyle, l'éthyle et le propylparabène respectivement. Cette exposition est retrouvée dans tous les établissements de santé étudiés et des différences significatives ont été observées en fonction de l'âge gestationnel à la naissance. Les nouveau-nés à terme et les très grands prématurés (<28 semaines d'aménorrhée) sont particulièrement exposés au méthyle et au propylparabène, tandis que l'exposition à l'éthylparabène concerne essentiellement les nouveau-nés à terme. Trente médicaments ont été impliqués dans l'exposition des nouveau-nés aux parabènes, avec des différences d'utilisation entre les centres. Nos recherches ont montré que certains d'entre eux peuvent être substitués, soulignant la nécessité de prise en compte de ces éléments dans le référencement des médicaments. Pour d'autres, des changements de pratiques et une modification des formulations galéniques par les industriels est nécessaire pour limiter l'exposition de ces enfants.

Concernant les possibilités de substitution, nous avons développé et évalué la stabilité de préparations hospitalières sans parabènes sur une durée de 60 jours, afin de proposer une alternative sans parabènes pour des molécules n'existant pas avec une forme galénique adaptée chez le nouveau-né. Enfin, la méthode de dosage ultrasensible mise au point a été validée selon les critères internationaux, permettant de doser les parabènes de façon fiable sur un faible volume d'échantillon (50 µL). Son applicabilité a été démontrée sur des échantillons plasmatiques issus de nouveau-nés.

Au final, ces travaux apportent un éclairage complet sur l'exposition des nouveau-nés aux parabènes en démontrant que les médicaments sont une source non-négligeable d'exposition. Nous apportons également des solutions alternatives dont la mise en œuvre permettra de diminuer cette exposition durant l'hospitalisation des nouveau-nés.

Mots clés : Exposition ; Perturbateurs endocriniens ; Médicaments ; Parabènes ; Nouveau-nés

## ABSTRACT

Parabens are recognized endocrine disruptors and are commonly used as conservatives in food and cosmetics, but also in medicines. According to the DOHAD (Developmental Origins of Health And Diseases), exposition to these compounds during early phases of life is a risk factor to develop chronic diseases later in life. Neonates, and especially premature, form a particularly vulnerable population to these compounds because of their metabolism immaturity and the development of their endocrine system. Nevertheless, the exposition of neonates to parabens has been minimally studied, especially the exposition through the administration of medicines.

The objective of this thesis is to study the exposition of neonates to parabens through the administration of medicines. To this end, our work consisted to : (i) Identify the medicines used in pediatric containing parabens et estimate the exposition to parabens with a cohort of more than 8000 neonates hospitalized in French healthcare institutions; (ii) Develop an ultrasensitive analytical method on blood, adapted to this population, to assess the portion attributable to medicines in this exposition, and (iii) Propose alternative strategies allowing to limit this exposition during the hospitalization of neonates.

Our results show a significant exposition of neonates, both terms and preterm, to three parabens. More than 50% of neonates were exposed once to methyle and propylparaben, this frequency of exposition decreases with the gestational age at birth. This trend was also found for ethylparaben. Mean values of exposition were  $0,654 \pm 0,892$ ,  $0,256 \pm 0,261$  et  $0,097 \pm 0,136$  mg/kg/d for methyle, ethyle and propylparaben, respectively. This exposition is found in every healthcare institutions and significant differences were found depending on the gestational age at birth. Terms and very high preterm infants (< 28 weeks of gestation) were particularly exposed to methyle and propylparaben, while the exposition to ethylparaben was higher for term neonates. Thirty medicines were involved in this exposition, with differences in use between centers. Our research showed that some of them may be substitute, underlining the need to consider these elements when referencing medicines. For others, change of practices and modification of galenic formulations by industrials are needed to reduce the exposition of neonates.

Regarding the possibility of substitution, we have developed and assessed the stability of pharmaceutical preparations without any parabens for 60 days, to propose an alternative without parabens for molecules not commercialized with a child-adapted dosage form. Finally, our ultrasensitive analytical method for the determination of parabens in blood has been validated according to international guidelines, allowing to reliably assess parabens blood concentrations in a

small volume of sample (50  $\mu\text{L}$ ). The applicability of the method was demonstrated on neonates plasmatic samples.

This work brings a comprehensive picture on the exposition of neonates to parabens, demonstrating that medicines are substantial source of exposure. We bring alternative solutions for which the implementation will allow to decrease the exposition of neonates during hospitalization.

Keywords: Exposure; Endocrine disruptors; Medicines; Parabens; Neonates