



**HAL**  
open science

# Synthèse des métabolites des plastifiants présents dans les dispositifs médicaux pour évaluation de leur cytotoxicité et de l'exposition des patients en chirurgie cardiaque

Teuta Bajrami Eljezi

► **To cite this version:**

Teuta Bajrami Eljezi. Synthèse des métabolites des plastifiants présents dans les dispositifs médicaux pour évaluation de leur cytotoxicité et de l'exposition des patients en chirurgie cardiaque. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français. NNT : 2019CLFAS028 . tel-03408808

**HAL Id: tel-03408808**

<https://theses.hal.science/tel-03408808v1>

Submitted on 29 Oct 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.

Année 2019

N° d'ordre

*ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,  
AGRONOMIE ET ENVIRONNEMENT*

*Thèse*

Présentée à l'Université Clermont-Auvergne

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité

**Sciences du médicament**

Soutenue le 02 décembre 2019

**ELJEZI TEUTA (née Bajrami)**

---

**Synthèse des métabolites des plastifiants présents dans les dispositifs médicaux pour évaluation de leur cytotoxicité et de l'exposition des patients en chirurgie cardiaque**

---

**Rapporteurs :** **Pr. Antoine Dupuis**, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, CHU de Poitiers - UFR de Médecine et de Pharmacie de Poitiers  
**Pr. Nicolas Masurier**, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie Montpellier.

**Membres :** **Pr. Valérie Sautou**, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Clermont-Auvergne - CHRU de Clermont-Ferrand (Directeur)  
**Dr. Moreau Emmanuel**, Maître de Conférences des Universités, Université Clermont-Auvergne, (Directeur)  
**Dr. Stéphanie Genay**, Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Lille, Droit et Santé - CHRU de Lille  
**Dr. Nancy Ty**, Maître de Conférences des Universités, Université Clermont-Auvergne



# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
<b>1<sup>ère</sup> PARTIE : .....</b>	<b>18</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>18</b>
<b>1. DISPOSITIFS MEDICAUX EN PVC PLASTIFIE .....</b>	<b>19</b>
1.1 Le PVC.....	19
1.1.1 Généralités .....	19
1.1.2 Historique .....	19
1.1.3 Données économiques.....	20
1.1.4 Place du PVC parmi les polymères .....	20
1.1.5 Synthèse des polymères et du PVC.....	21
1.1.6 Fabrication industrielle du PVC.....	23
1.1.7 Propriétés physico-chimiques du PVC.....	26
1.1.8 Utilisation des additifs dans le PVC.....	27
1.2 Les plastifiants .....	27
1.2.1 Généralités .....	27
1.2.2 Historique .....	28
1.2.3 Données économiques.....	28
1.2.4 Rôle des plastifiants dans le PVC et mécanisme d'action .....	29
1.2.5 Classification des plastifiants utilisés dans les DM en PVC plastifié .....	29
1.2.6 Utilisation du DEHP dans les DM.....	30
1.2.7 Plastifiants alternatifs au DEHP .....	31
1.2.8 Propriétés physico-chimiques du DEHP et des plastifiants alternatifs .....	33
1.2.9 Synthèse et fabrication industrielle des plastifiants .....	35

1.2.9.1	Généralités .....	35
1.3	Applications médicales du PVC plastifié .....	37
1.3.1	Généralités .....	37
1.3.2	Fabrication des DM en PVC plastifié .....	37
1.3.3	Méthodes d'analyse des plastifiants dans les DM .....	38
1.3.3.1	Les méthodes directes .....	39
1.3.3.2	Les méthodes indirectes .....	40
1.3.3.3	Techniques d'extractions des plastifiants à partir des DM.....	42
<b>2.</b>	<b>PROBLEMATIQUE DE LA MIGRATION DES PLASTIFIANTS A PARTIR DES DM ET EXPOSITION DES PATIENTS .....</b>	<b>44</b>
2.1	La migration des plastifiants.....	44
2.1.1	Etudes <i>ex vivo</i> .....	44
2.1.2	Etude <i>in vivo</i> .....	48
2.1.3	Mécanismes de migration du plastifiant à partir du DM. ....	48
2.1.3.1	Diffusion et transport de matière d'un milieu à un autre .....	49
2.1.3.2	Modèle mathématique utilisé en agroalimentaire.....	50
2.1.4	Aspect réglementaire : limites de migration acceptables .....	51
2.2	EXPOSITION AUX PLASTIFIANTS .....	54
2.2.1	Valeurs de référence .....	55
2.2.1.1	L'apport journalier (AJ ou DI).....	55
2.2.2	Les valeurs toxicologiques de référence .....	56
2.2.2.1	La dose dérivée sans effet ou DNEL.....	57
2.2.2.2	La dose journalière tolérable (DJT).....	58
2.2.3	Exposition humaine au DEHP et aux plastifiants alternatifs provenant de l'environnement.....	58
2.2.4	Exposition aux plastifiants <i>via</i> les procédures médicales .....	60
<b>3.</b>	<b>TOXICOCINETIQUE ET TOXICITE DES PLASTIFIANTS.....</b>	<b>65</b>
3.1	Toxicocinétique.....	65

3.1.1	Généralités .....	65
3.1.2	Toxicocinétique des plastifiants .....	65
3.1.2.1	Absorption.....	65
3.1.2.2	Distribution .....	67
3.1.2.3	Métabolisme et élimination.....	67
3.2	TOXICITE .....	74
3.2.1	Généralités .....	74
3.2.2	Définitions .....	76
3.2.3	Mécanisme de toxicité .....	77
3.2.4	Toxicité animale .....	79
3.2.5	Toxicité chez l'homme.....	86
<b>2<sup>ème</sup></b>	<b>PARTIE : .....</b>	<b>89</b>
	<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>89</b>
	<b>ETUDE 1. SYNTHESSES ET ETUDE PRELIMINAIRE DE CYTOTOXICITE <i>IN VITRO</i> DES PLASTIFIANTS ALTERNATIFS ET LEURS METABOLITES PRIMAIRES UTILISES DANS LA COMPOSITION DES DISPOSITIFS MEDICAUX EN PVC PLASTIFIE .....</b>	<b>90</b>
	<b>ETUDE 2. SYNTHESE ET ETUDE PRELIMINAIRE DE CYTOTOXICITE <i>IN VITRO</i> DES METABOLITES SECONDAIRES DU DEHP, DINP ET DINCH UTILISES DANS LA COMPOSITION DES DISPOSITIFS MEDICAUX EN PVC PLASTIFIE.....</b>	<b>111</b>
	<b>ETUDE 3. EXPOSITION DES PATIENTS AUX PLASTIFIANTS EN CHIRURGIE CARDIOVASCULAIRE VIA LES DM.....</b>	<b>128</b>
	<b>DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>154</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>160</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>174</b>
	<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>174</b>
	<b>ANNEXE 2.....</b>	<b>186</b>
	<b>ANNEX 3.....</b>	<b>199</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

- 1- MEHTM - Trimellitate de 1-mono- (2-éthylhexyle)
- 2cx-1- MMHTM - Trimellitate de 1-mono- (2-carboxyméthylhexyle)
- 2cx-2-MMHTM - Trimellitate de 2- mono- (2-carboxyméthylhexyle)
- 2-MEHTM - Trimellitate de 2-mono- (2-éthylhexyle)
- 4-MEHTM - 4-mono- (2-éthylhexyle)
- 5cx-1-MEPTM - Trimellitate de 1-mono- (2-éthyl-5- carboxypentyl)
- 5cx-2-MEPTM - Trimellitate de 2-mono- (2-éthyl-5-carboxypentyl)
- 5OH - 2-MEHTM - 2-mono- (2-éthyl-). 5-hydroxyhexyl) trimellitate
- 5OH-1-MEHTM - Trimellitate de 1-mono- (2-éthyl-5-hydroxyhexyle)
- 5-OH-MEHP - (Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) 1,2-benzenedicarboxylate)
- 5oxo-1-MEHTM - 1-mono- (2-éthyl-5-oxohexyl) trimellitate
- 5oxo-2-MEHTM - 2-mono- (2-éthyl-5-oxohexyl) trimellitate
- 5-oxoMEHP - (Mono(2-ethyl-5-oxohexyl) 1,2-benzenedicarboxylate)
- 7-cx-MMeOCH - 2-(((7-Carboxy-4-methylheptyl)oxy)carbonyl)cyclohexane-1-carboxylic acid
- 7-cx-MMeOP - 2-(((7-Carboxy-4-methylheptyl)oxy)carbonyl)benzoic acid
- 7-OH-MMeOCH - 2-(((7-Hydroxy-4-methyloctyl)oxy)carbonyl)cyclohexane-1-carboxylic acid
- 7-OH-MMeOP - 2-(((7-Hydroxy-4-methyloctyl)oxy)carbonyl)benzoic acid
- 7-oxo-MMeOCH - 2-(((4-Methyl-7-oxooctyl)oxy)carbonyl)cyclohexane-1-carboxylic acid
- 7-oxo-MMeOP - 2-(((4-Methyl-7-oxooctyl)oxy)carbonyl)benzoic acid
- ACD - Anticoagulant citrate
- ADME - Absorption, Métabolisme, Distribution, Elimination
- AIBN - Azobis(isobutyronitrile)
- AJ - Apport journalier
- ANSM - Agence Nationale de Sécurité du Médicament
- ARMED<sup>®</sup> - Assessment and Risk Management of Medical Devices in plasticized polyvinylchloride
- AZO - Azodicarbonamide

BBP - Benzyl butyl phthalate

BHT - Butylhydroxytoluène

BPA - Bisphénol A

CAS - Chemical Abstracts Service

CCV - Chirurgie Cardio Vasculaire

CEC - Circulation Extracorporelle

CHU - Centre Hospitalier Universitaire

CLHP-UV - Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la détection UltraViolet (en anglais, HPLC-UV - High Performance Liquid Chromatography-UltraViolet detection)

CL-SM/SM -Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

CMR 1B - Produits cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction

CPG - Chromatographie en Phase Gazeuse

CPP - Comité de Protection des Personnes

CPS - Chromatographie en Phase Supercritique

CVM - Chlorure de vinyle monomère

cx-MEHP - (Mono(5-carboxy-2-ethylpentyl) 1,2-benzenedicarboxylate)

Danish EPA - Danish Environmental Protection Agency

DART - Direct Analysis in Real Time

DCE – Dichlorure d'éthylène

EDC - Ethylene dichloride

DEHA - Di-2-ethylhexyl Adipate (DEHA)

DI - Daily Intake

DJT - Dose Journalière Tolérable

DL<sub>50</sub> - Dose létale 50

DM - Dispositifs médicaux

DMA - Diméthylacétamide

DNEL - Derived No-Effect Levels

DNPT - Dinitrosopentaméthylènetétramine

DSC - Differential Scanning Calorimetry

EC / List name - European Community name / List name assigned by ECHA

EC / List no. - European Community number / List number assigned by ECHA

ECHA - European Chemicals Agency

ECMO - Extracorporeal Membrane Oxygenation

EFSA - European Food Safety Authority

ESBO - Huile de soja époxydée

FT - Fourier Transform Raman Spectroscopy

FTIR - Fourier Transform-Infrared Spectroscopy

GC-MS - Gas Chromatography-Mass Spectrometry

HCl - Acide chlorhydrique

HPLC-ELDS - High Performance Liquid Chromatography- Evaporative Light Scattering Detector

HS - Head-Space

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

LC-MS/MS - Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry

LMA - Limites de Migration Acceptables

LOEL - Low Observed Effect Level

M - Monomère

MAE - Microwaves Extraction

MEHA- 6-((2-Ethylhexyl)oxy)-6-oxohexanoic acid

MEHP - Mono(2-ethylhexyl) phthalate

MEHT - 4-(((2-Ethylhexyl)oxy)carbonyl)benzoic acid

MINCH - 2-(((7-Methyloctyl)oxy)carbonyl)cyclohexanecarboxylic acid

MINP - 2-(((7-Methyloctyl)oxy)carbonyl)benzoic acid

MMeOCH – 2-(((4-Methyloctyl)oxy)carbonyl)cyclohexane-1-carboxylic acid

MMeOP - 2-(((4-Methyloctyl)oxy)carbonyl)benzoic acid

MOTM - 2-(((2-Ethylhexyl)oxy)carbonyl)terephthalic acid and 4-(((2-ethylpentyl)oxy)carbonyl)isophthalic acid

N°EINECS - European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances

NICNAS - National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme

NIR - Near-Infrared Spectroscopy

NMR - Nuclear Magnetic Resonance

NOAEL - No Observed Adverse Effect Level

PA - Polyamides

PE - Polyéthylène

PE - Polyéthylène

PET - Polytéraphthalate d'éthylène

PMPPIC - Poly[méthylène (polyphénylisocyanate)]

PP - Polypropylène

PS - Polystyrène

PVC - Polychlorure de vinyle

REACH - Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals.

SCIENIHR - Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks

SFC - Supercritical Fluid Chromatography

SFE - Supercritical Fluid Extraction

TDI - Tolerable Daily Intake

TGA - Thermogravimetric Analysis

THF - Tétrahydrofurane

TOTM (TEHTM) - Monoester TEHTM (MOTM),

UDP - Glucuronosyltransférases (uridine diphosphate glucuronosyl-transférase ou UGT)

VTR - Valeurs Toxicologiques de Référence

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Objectifs et étapes de la thèse .....	16
Figure 2. Structure des polymères [37].....	21
Figure 3. Polymérisation par étapes [37] .....	22

Figure 4. Polymérisation en chaînes [37] .....	22
Figure 5. Phase de terminaison par combinaison ou dismutation [37].....	23
Figure 6. Fabrication industrielle du PVC [36].....	24
Figure 7. Fabrication du chlorure de vinyle monomère (CVM) selon le procédé mixte de gaz de naphtha (gaz de pétrole liquéfié) [38] .....	24
Figure 8. Représentation schématique de la fabrication moderne du PVC [40]. .....	25
Figure 9. Polymérisation du chlorure de vinyle monomère (CVM) en PVC [40].....	25
Figure 10. Classement des plastifiants utilisés dans le PVC plastifié (R est une chaîne aliphatique) [42].....	29
Figure 11. Différence entre un plastifiant et un solvant ou lubrifiant [40].....	33
Figure 12. Synthèse des plastifiants diester [41] (page 73) .....	36
Figure 13. Fabrication industrielle des plastifiants alternatifs [51]. .....	36
Figure 14. Profil de concentration d'un contaminant dans l'aliment au cours du temps [91]	50
Figure 15. Evaluation des risques de l'exposition des populations aux plastifiants.....	55
Figure 16. Métabolisme des xénobiotiques [107] .....	68
Figure 17. La réaction de glucurono-conjugaison .....	69
Figure 18. Métabolisme du DEHP chez l'homme après administration par voie orale (étudié par Koch et al 2006 et décrit dans le rapport SCENIHR 2015 [4,124]). .....	70
Figure 20. Cible des phtalates [107].....	78

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1. Principaux plastifiants utilisés dans les dispositifs médicaux et leurs métabolites primaires et secondaires correspondants.....	13
Tableau 2. Propriétés physico-chimiques du PVC pure .....	26
Tableau 3. Structure et identification du DEHP .....	30
Tableau 4. Structure et identification des plastifiants alternatifs .....	32
Tableau 5. Propriétés physico-chimiques des principaux plastifiants utilisés dans les DM ....	34
Tableau 6. Etudes <i>ex vivo</i> de migration des plastifiants à partir des dispositifs médicaux ....	45
Tableau 7. Estimation de l'exposition journalière au DEHP et aux plastifiants alternatifs exprimée en AJ ou DI ( $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ ).....	56

Tableau 8. DNEL des plastifiants pour une administration à long terme par voie pulmonaire, cutanée et orale dans la population générale, (ECHA, 2014b). .....	57
Tableau 9. NOAEL (mg / kg / j) du DEHP et plastifiants alternatifs [4]. .....	58
Tableau 10. Les valeurs des doses journalières tolérables (DJT ou TDI en anglais) par voie orale du DEHP et des plastifiants alternatifs établies après les évaluation de risques [45]. .....	58
Tableau 11. Exposition humaine au DEHP et aux plastifiants alternatifs provenant de différentes sources environnementales [45]. .....	59
Tableau 12. Exposition des adultes au DEHP suivant certaines procédures médicales [4]. ....	61
Tableau 13. Evaluation de l'exposition <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i> de la population pour un type de DM selon les études de migration des plastifiants alternatifs ( <i>les données concernant le DEHP sont mentionnées à titre comparatif</i> ). .....	62
Tableau 14. Taux d'absorption par voies orale, pulmonaire, cutanée et intraveineuse des plastifiants chez l'homme et l'animal [4,101,128–130]. .....	66
Tableau 15 : Métabolites primaires et secondaires des plastifiants, biomarqueurs spécifiques, demi-vies et pourcentages excrétés dans l'urine .....	72
Tableau 17. Données de toxicité du DINP issues d'expérimentations animales. ....	81
Tableau 18. Données de toxicité du DINCH issues d'expérimentations animales. ....	82
Tableau 19. Données de toxicité du DEHT issues d'expérimentations animales. ....	83
Tableau 20. Données de toxicité du DEHA issues d'expérimentations animales. ....	84
Tableau 21. Données de toxicité du TOTM issus d'expérimentations animales. ....	85
Tableau 22. Métabolites primaires et secondaires des plastifiants alternatifs .....	91
Tableau 23. Métabolites primaires et secondaires des plastifiants DINCH et DINP. ....	112
Tableau 24. Les valeurs des doses journalières tolérables DJT (TDI en anglais) par voie orale du DEHP et des plastifiants alternatifs. ....	129
Tableau 25. Valeurs NOAEL (mg / kg / j) par voie orale des plastifiants issues des études de toxicité animale [4]. .....	129

## INTRODUCTION

### Contexte scientifique

En milieu hospitalier, de nombreux dispositifs médicaux (DM) (lignes de circulation extracorporelle, perfuseurs, prolongateurs...) plastifiés en polychlorure de vinyle (PVC) sont utilisés chaque jour à travers le monde. Ces DM sont plastifiés de manière à leur conférer de l'élasticité et de la flexibilité *via* l'ajout de composés appelés plastifiants dans la matrice même du PVC. Le **DEHP** (Di-(2-ethylhexyl)phthalate) a été le plastifiant le plus utilisé pendant plusieurs années dans les DM. Suite à de nombreuses études menées durant la décennie passée, il a été démontré que le **DEHP** n'étant pas lié de manière covalente à la matrice de PVC, avait la capacité de migrer et d'entrer en contact avec le patient *via* le fluide contenu dans le DM utilisé. Il a aussi été mis en évidence que le **DEHP** était métabolisé en un composé primaire MEHP (mono(2-ethylhexyl) phthalate,) et des composés secondaires le 5-OH-MEHP (Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) 1,2-benzenedicarboxylate), 5-oxo-MEHP (Mono(2-ethyl-5-oxohexyl) 1,2-benzenedicarboxylate), 5-carboxy-MEHP (Mono(5-carboxy-2-ethylpentyl) 1,2-benzenedicarboxylate) [1] [2] [3]. L'ensemble de ces composés s'est avéré toxique au travers de nombreuses études menées chez l'animal et chez l'homme [4]. Le **DEHP** a finalement été classé CMR 1B (cancérogène, mutagène ou toxique pour la reproduction) en vertu du Règlement CLP (Union européenne, R 2008), car il présente un danger potentiel pour le patient [5]. L'utilisation du **DEHP** dans le PVC d'un DM est maintenant restreinte par les autorités européennes (taux limité à 0,1% en masse de **DEHP** i.e. masse de plastifiant/masse de PVC plastifié) dans les DM ne mentionnant pas la présence de **DEHP** sur l'étiquetage (Règlement européen 2017/745 du parlement européen et du conseil du 5 avril 2017 relatif aux dispositifs médicaux) [6].

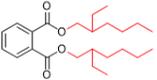
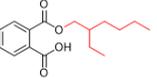
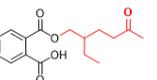
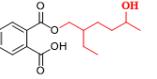
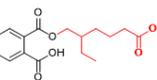
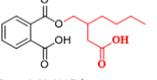
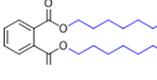
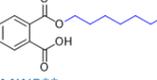
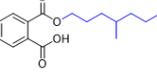
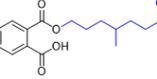
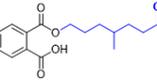
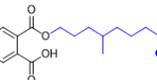
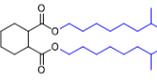
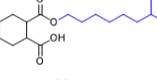
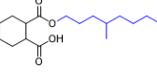
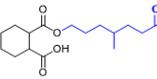
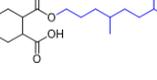
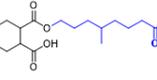
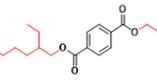
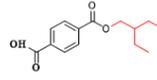
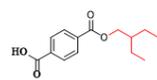
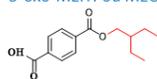
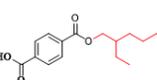
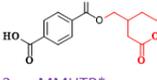
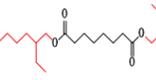
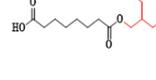
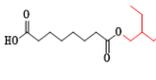
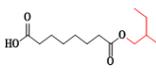
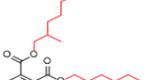
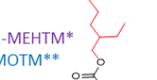
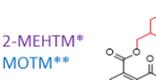
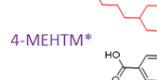
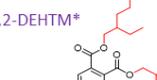
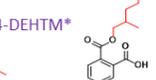
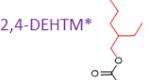
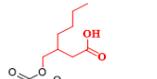
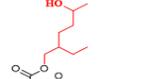
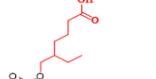
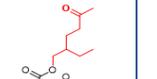
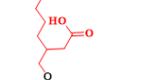
Dès 2008, les experts du SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks) ont alerté sur les risques du **DEHP** intégré au PVC des DM et proposé des plastifiants alternatifs [4,7]. Parmi les plastifiants alternatifs au **DEHP**, les plus utilisés sont :

- Di-isononyl-1,2-cyclohexanedicarboxylate (**DINCH**, CAS 166412-78-8)
- Di-isononyl phtalate (**DINP**, CAS 68515-48-0 and 28553-12-0)
- Di-(2-ethylhexyl) adipate (**DEHA**, CAS 103-23-1)
- Di-(2-ethylhexyl) terephtalate (**DEHT**, CAS 6422-86-2)
- Trioctyl trimellitate(**TOTM**, CAS 3319-31-1)

Ces plastifiants n'étant également pas liés de manière covalente au PVC, ils possèdent comme le **DEHP**, la capacité de migrer du DM vers le fluide contenu dans celui-ci (sang, médicament perfusé) et peuvent ainsi entrer en contact avec le patient [8–14]. Ces plastifiants alternatifs se transforment également *in vivo* en des métabolites primaires et/ou secondaires [3,15–21]. L'ensemble des plastifiants et leurs métabolites sont présentés dans le **Tableau 1** de la page suivante. Il ne s'agit pas d'un recensement exhaustif mais l'ensemble de ces produits constitue

des métabolites spécifiques, en l'occurrence des biomarqueurs reconnus par la communauté scientifique.

**Tableau 1. Principaux plastifiants utilisés dans les dispositifs médicaux et leurs métabolites primaires et secondaires correspondants.**

Plastifiants	Métabolites primaires	Métabolites secondaires	Références	
 DEHP*	 MEHP*	 5-oxo-MEHP* 5-oxo-MEHP**  5OH-MEHP* 5-OH-MEHP**  5cx-MEPP* 5-cx-MEHP**  2cx-MMHP*	Koch et al. 2005	
 DINP*	 MINP**  MmOP* MMeOP**	 oxo-MINP* oxo-MMeOP* 7-oxo-MMeOP**  OH-MINP* 7OH-MMeOP* 7-OH-MMeOP**  7carboxy-MMeHP* 7-cx-MMeOP**	Koch et al. 2007	
 DINCH*	 MINCH**  MINCH* MMeOCH**	 oxo-MINCH* 7-oxo-MMeOCH**  OH-MINCH* 7-OH-MMeOCH**  cx-MINCH* 7-cx-MMeOCH**	Koch et al. 2013	
 DEHT* DEHTP*	 MEHTP* MEHT** MEHTP	 5-oxo-MEHTP* 5-oxo-MEHT ou MEOHTP  5-OH-MEHTP* 5-OH-MEHT ou MEHTP  5-cx-MMHTP* 5-Cx-MEHT ou MECPTP  2-cx-MMHTP*	Frederik Lessmann et al. 2017	
 DEHA*	 MEHA*  MEOHA*  MEHHA*		Manori J. Silva et al. 2013	
 TOTM* TEHTM*	 1-MEHTM* MOTM**  2-MEHTM* MOTM**  4-MEHTM*	 1,2-DEHTM*  1,4-DEHTM*  2,4-DEHTM*	 2-cx-1-MMHTM*  5OH-1-MEHTM*  5cx-1-MEPTM*  5-oxo-2-MEHTM*  2-cx-2-MMHTM*  5OH-2-MEHTM*  5cx-2-MEPTM*  5-oxo-2-MEHTM*	Christine Höllerer et al. 2018

\*nomenclature des autres auteurs; \*\*notre nomenclature

Ces plastifiants alternatifs et leurs métabolites ont fait, et font encore l'objet de nombreuses études. Bien qu'ils semblent moins dangereux pour les patients, il n'en demeure pas moins que leur exposition *via* les DM peut induire des effets nocifs concernant la fertilité ou le développement du fœtus et du nouveau-né. Le **DINP** et le **DINCH** sont également suspectés d'être des perturbateurs endocriniens *via* leurs métabolites [4,22–26]. Des études supplémentaires sont donc encore nécessaires pour déterminer si ces plastifiants peuvent effectivement constituer une alternative sans risques majeurs d'exposition pour le patient hospitalisé.

### Environnement scientifique

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet ARMED® (Assessment and Risk Management of Medical Devices in plasticized polyvinylchloride), porté par le CHU de Clermont-Ferrand sous la coordination du Pr Valérie Sautou et soutenu financièrement par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et produits de santé (ANSM). Ce projet mené de 2013 à 2016 consiste en l'évaluation du risque lié à l'exposition des patients à des plastifiants alternatifs au **DEHP** (**DEHA**, **DEHT**, **DINCH**, **DINP** et **TOTM**). Les premières expérimentations réalisées *ex vivo* ont montré que ces nouveaux plastifiants migrent à partir de la matrice en PVC des DM et sont donc susceptibles d'exposer les patients à des risques. Le **DINCH** et le **DINP** ont une capacité importante de migration proche de celle du **DEHP** et bien supérieure à celle du **DEHT** ou du **TOTM** [27].

Notre projet de thèse s'inscrit dans la continuité de ces premières études de migration de certains plastifiants alternatifs. Nous nous sommes focalisés sur l'exposition à ces plastifiants des patients à risques et plus particulièrement ceux des services de chirurgie cardiovasculaire et de réanimation car la prise en charge de ces patients nécessite l'utilisation de nombreux DM en PVC plastifié. A titre d'exemple, lors de l'utilisation d'une circulation extracorporelle pendant une intervention cardiaque, le sang entrant en contact avec le PVC est susceptible de favoriser la migration des plastifiants du PVC et d'induire leur métabolisation immédiate par hydrolyse enzymatique par les lipases plasmatiques.

Pour mener à bien cette évaluation, nous avons entrepris la démarche scientifique préconisée dans le cadre du projet ARMED® à savoir :

- (1) une étude en laboratoire permettant d'évaluer la migration des plastifiants alternatifs.
- (2) une étude clinique menée sur une cohorte de patients de chirurgie cardiovasculaire des CHU de Clermont-Ferrand et de Lille.

Concernant l'étude préclinique, notre travail a été divisé en trois axes :

- Les synthèses des métabolites primaires et secondaires des plastifiants alternatifs au **DEHP** tels que le **DEHT**, le **TOTM**, le **DINCH** et le **DINP**.
- Des études de cytotoxicité de ces composés sur des cellules murines L929 selon la norme EN 10993-5 utilisée dans le cadre des études de biocompatibilité des dispositifs médicaux
- L'utilisation des produits synthétisés en qualité de références pour le développement et l'étalonnage des méthodes de dosage des métabolites dans les prélèvements urinaires des patients.

Concernant l'étude clinique, nous avons également trois axes d'études complémentaires :

- Le recensement des DM utilisés dans les services de chirurgie cardiovasculaire des CHU de Clermont-Ferrand
- Le dosage des plastifiants dans les différents DM par GC-MS
- L'évaluation de la dose d'exposition *via* un modèle mathématique.

NB : le dosage des métabolites urinaires dans la population étudiée est en cours de réalisation et ne sera donc pas intégré dans le travail présenté.

Ces différentes étapes de notre projet doctoral sont décrites dans la **Figure 1** suivante.

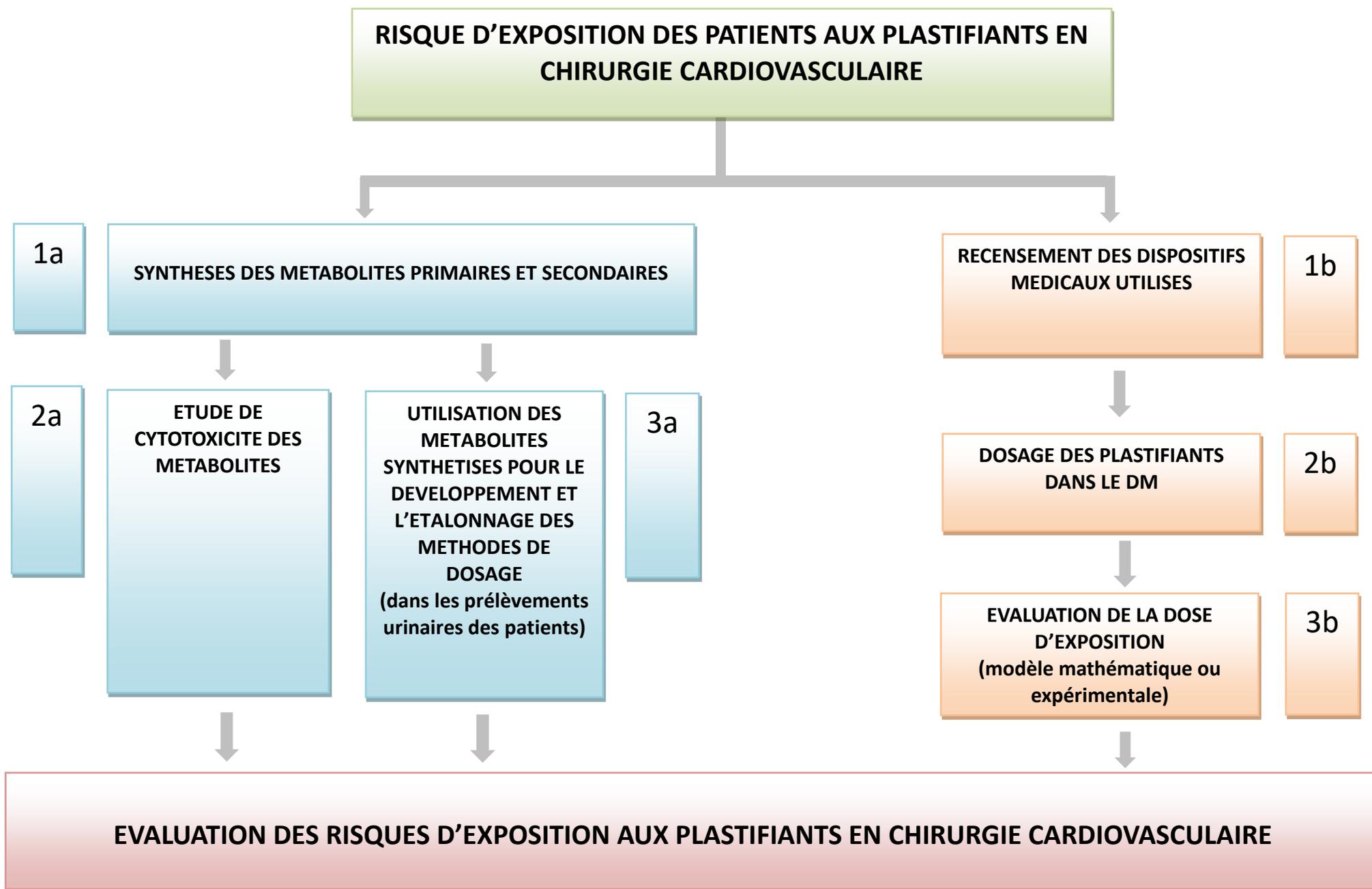


Figure 1 : Objectifs et étapes de la thèse.

L'ensemble de nos travaux a d'ores et déjà été valorisé :

1) Trois articles scientifiques publiés :

**P1. T. Eljezi**, P. Pinta, D. Richard, J. Pinguet, JM, Chezal, MC. Chagnon, V. Sautou, G. Grimandi, E. Moreau. (2017) **In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line.** *Chemosphere* 173, 452-459.

**P2. T. Eljezi**, P. Pinta, F. Nativel, D. Richard, J. Pinguet, O. Roy, V. Sautou, G. Grimandi, E. Moreau. ARMED study group. (2019) **In vitro cytotoxic effects of secondary metabolites of DEHP and its alternative plasticizers DINCH and DINP on a L929 cell line.** *Int. J. Hyg. Environ. Health* 222(3), 583-589.

**P3.** J. Pinguet, N, Kerckhove, **T. Eljezi**, C. Lambert, E. Moreau, L. Bernard, B. Boeuf, B. Decaudin, S. Genay, M. Masse, L. Storme, V. Sautou, D. Richard, for the ARMED Study Group. (2019) **New SPE-LC-MS/MS method for the simultaneous determination in urine of 22 metabolites of DEHP and alternative plasticizers from PVC medical devices.** *Talanta* 198( 1), 377-389.

2) Deux communications écrites :

**CE1. Congrès national de la Société Chimique de France à Montpellier (du 2 au 4 juillet 2018).**

**T. Eljezi**, P. Pinta, D. Richard, J. Pinguet, J.M Chezal, M. Ch Chagnon, V. Sautou, G. Grimandi, E. Moreau. In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers used in PVC medical devices and their primary metabolites.

**CE2. SMAP 2015 Ajaccio, 15-18 Septembre 2015**

J. Pinguet, L. Roche, E. Moreau, **T. Eljezi**, L. Bernard, V. Sautou, D. Richard for Armed study group. Exposition des patients aux plastifiants au cours de leur hospitalisation : suivi biologique urinaire par LC/MS/MS.

Ce manuscrit de thèse s'articule en trois parties distinctes. Après une étude bibliographique qui présente les notions nécessaires relatives aux plastifiants pour une bonne compréhension du contexte scientifique de ce projet, nous exposerons ensuite les résultats obtenus durant ces quatre années de thèse sous la forme de publications.

Nous terminerons ce manuscrit par une discussion suite aux résultats globaux que nous avons obtenus et exposerons les perspectives de notre projet.

**1<sup>ère</sup> PARTIE :**

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1. DISPOSITIFS MEDICAUX EN PVC PLASTIFIE**

Pour rendre leur utilisation plus facile, de nombreux dispositifs médicaux (DM) sont plastifiés avec des composés de type phtalate. Certains sont connus pour leur toxicité et sont classés avec les produits cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction (CMR) 1B, selon le Règlement CLP 1272/2008. Avant de revenir plus longuement sur la notion de DM en PVC plastifié et l'exposition des patients aux risques encourus, nous allons tout d'abord aborder les notions de polymères et de plastifiants.

### **1.1 Le PVC**

#### **1.1.1 Généralités**

Le PVC est un polymère synthétique issu des monomères provenant du pétrole. C'est une matière plastique qui remplace le caoutchouc naturel. Le PVC existe principalement en deux formes : rigide et flexible. La forme rigide est utilisée par exemple dans la fabrication des fenêtres et des tuyaux. La forme flexible a d'autres applications comme les câbles ignifugeants, les sols ainsi que dans les tubulures pour les DM. Pour avoir un PVC flexible, des additifs appelés plastifiants sont ajoutés au polymère. Afin de lui conférer d'autres propriétés, l'ajout d'additifs supplémentaires comme les colorants, stabilisants, lubrifiants, ignifugeants sont également nécessaires. La résistance à l'eau, la propriété ininflammable et le prix ont fait de lui un des polymères les plus utilisés dans le monde [28] après le polyéthylène (PE) et polystyrène (PS). A titre d'exemple, les tuyauteries en PVC sont finalement parvenues à remplacer définitivement celles en cuivre ou en plomb [29].

#### **1.1.2 Historique**

Les matières plastiques naturelles ont été utilisées durant toutes les périodes des civilisations humaines. Selon un document daté de 1470 av J-C, l'antiquité Egyptienne fait état de l'utilisation de matières plastiques pour la fabrication des meubles avec de la colle à base de gélatine d'os [30]. Mais le développement de l'industrie pétrochimique au cours des 60 dernières années a révolutionné l'industrie du plastique : Ce dernier est devenu tellement important dans la société moderne que, selon Thompson. et al, le 20<sup>ème</sup> siècle a été nommé « l'âge du plastique » [31]. La fabrication du PVC est réalisée pour la première fois par le chimiste Eugen Baumann en 1872 mais le procédé n'a pas été breveté [32]. Le produit n'a eu que peu de valeur jusqu'aux alentours de l'année 1926. La découverte des polymères dans les années 1920 est finalement due à Hermann Staudinger, prix Nobel de chimie 1954. Cette découverte ouvre la voie à la science et à la technologie des polymères [33]. Le scientifique allemand Friedrich Klatte est le premier à breveter le procédé de fabrication du PVC avec la lumière du soleil [34].

### 1.1.3 Données économiques

L'Europe (Allemagne, Italie France, Espagne, Pologne, etc..) est le deuxième producteur des matières plastiques (19 %) derrière la Chine (29 %) [28]. La production mondiale de matières plastiques en 2016 était de 335 millions de tonnes. La production européenne pour l'année 2016 est de 60 millions de tonnes qui se traduit par un chiffre d'affaire de 350 milliards d'euros. Cette industrie emploie environ 1,5 millions de personnes en Europe. Le polychlorure de vinyle (PVC), le polyéthylène (PE) et le polypropylène (PP) sont les matières plastiques les plus demandées en Europe (60 %) [35]. En ce qui concerne le PVC, l'Europe produit environ 5 millions de tonnes par an [36]. Face à ce chiffre impressionnant concernant la production de PVC, il faut cependant noter que cela représente moins de 1 % de la consommation du pétrole pour sa fabrication [29]. Environ 70 % de la production du PVC concerne le PVC rigide. Le succès commercial du PVC flexible est lié à la découverte et au développement des additifs.

### 1.1.4 Place du PVC parmi les polymères

Un polymère est une substance composée de macromolécules formées par la répétition des unités monomères liées par des liaisons covalentes. Le monomère est un composé constitué de molécules simples pouvant réagir avec d'autres monomères pour donner un polymère. Contrairement au polymère, un monomère a une faible masse moléculaire.

1) Selon leur origine, on distingue :

- *Les polymères naturels* comme les polysaccharides (l'amidon ou cellulose), acides nucléiques (exemple de l'ADN) ou protéines (caoutchouc naturel, laine ou soie)
- *Les polymères artificiels* obtenus par modification des polymères naturels (la nitrocellulose).
- *Les polymères artificiels ou synthétiques* obtenus par la pétrochimie (Polyéthylène (PE), polypropylène (PP), polychlorure de vinyle (PVC), polyamides (PA) ou les nylons.

2) Selon leur structure, on distingue :

- *Les homopolymères* formés à partir d'un unique monomère. Par exemple, le polystyrène (PS) est formé à partir du monomère styrène, tandis que le PVC est formé à partir du monomère chlorure de vinyle.
- *Les copolymères* formés à partir de monomères différents. Par exemple, le polytéréphtalate d'éthylène (PET) est formé par la polycondensation de l'acide téréphtalique et de l'éthylène glycol.

Selon leur structure, on distingue également les polymères linéaires, ramifiés ou réticulés (Figure 2).

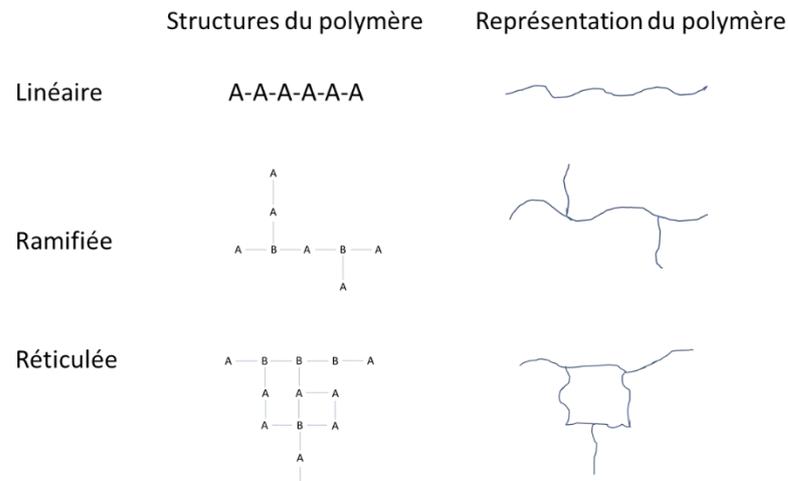


Figure 2. Structure des polymères [37].

3) Selon leurs propriétés thermiques, on distingue :

- *Les polymères thermoplastiques* contenant une chaîne linéaire ou ramifiée, qui sous l'effet de la chaleur, ramollissent jusqu'à l'état liquide et se solidifient par refroidissement. Ce phénomène physique, réversible les rend réutilisables et recyclables. La solubilité dans des solvants organiques et la propriété décrite préalablement font que ces polymères synthétiques sont les plus utilisés. Le PVC et le PE sont des polymères thermoplastiques.
- *Les polymères thermodurcissables* hautement réticulés sont constitués d'un réseau tridimensionnel de molécules obtenu pendant la polymérisation. Le phénomène est irréversible et conduit à un matériau rigide non réutilisable. Pour réussir la réticulation et le pontage des chaînes stables en réseau tridimensionnel avec une grande résistance thermomécanique et chimique, le mélange d'une résine (monomère, pré polymère) et d'un second monomère ou agent réticulant est nécessaire. Les silicones font partie des polymères thermodurcissables.

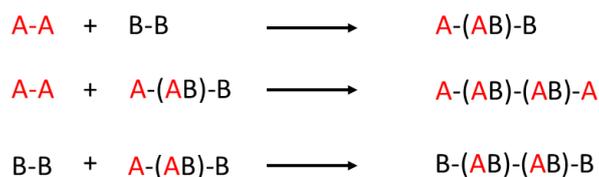
Selon ces classements, le PVC est un homopolymère synthétique, linéaire et thermoplastique.

### 1.1.5 Synthèse des polymères et du PVC

La synthèse des polymères peut être réalisée selon une polymérisation par étapes ou en chaîne.

*La polymérisation par étapes* est une réaction organique classique entre deux molécules contenant au moins deux groupements fonctionnels A et B.

Le (AB) constitue l'unité de la macromolécule (**Figure 3**).

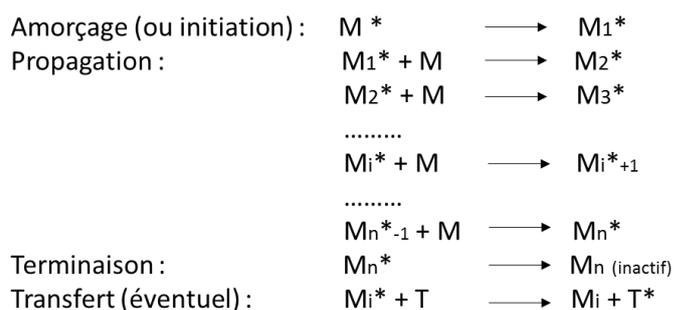


**Figure 3. Polymérisation par étapes [37].**

Si la condensation de A-A et B-B s'effectue par l'élimination d'une molécule d'eau, d'acide chlorhydrique (HCl) ou d'alcool, la réaction peut être appelée polycondensation. Chaque fonction A réagit avec B en formant une macromolécule par incorporation des morceaux de taille conséquente ou par « coup » (et non progressivement comme pour la polymérisation en chaîne). Quand le monomère contient plus de deux groupes fonctionnels, il y a réticulation du polymère et formation d'un réseau tridimensionnel. La croissance de la molécule a ainsi lieu par étapes [37].

Pour effectuer *des polymérisations en chaîne*, les monomères doivent contenir au moins une insaturation de type carbone-carbone tels que les alcènes et les alcynes (aliphatiques ou cycliques) ou carbone-oxygène (aldéhyde, cétone). Une réaction de polyaddition sans libération de sous-produit est une réaction de polymérisation en chaîne [37].

Dans la polymérisation en chaîne, la macromolécule est construite progressivement par additions successives des molécules de monomère (M) sur un centre actif (\*) (carboradical, carbocation, carbanion...) porté par la chaîne macromoléculaire en cours de croissance. Il y a alors obligatoirement trois phases (**Figure 4**) :



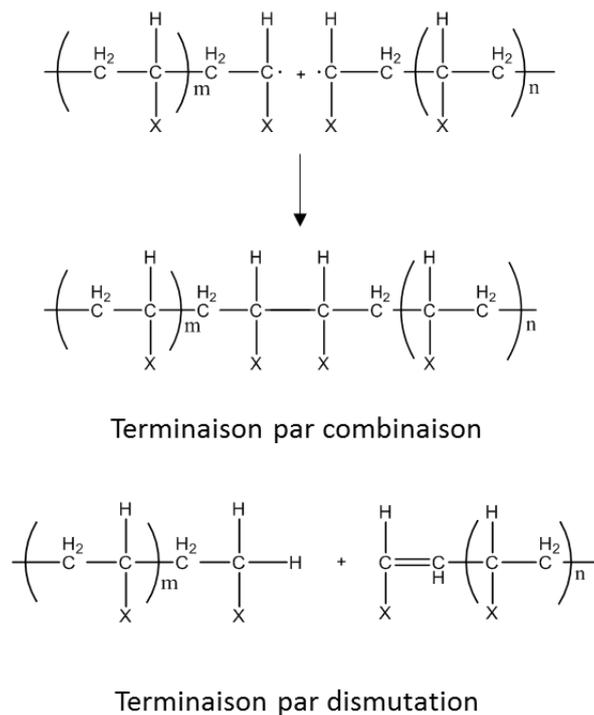
**Figure 4. Polymérisation en chaînes [37].**

La phase d'amorçage (l'amorceur le plus utilisé est AIBN (azobis(isobutyronitrile))) se réalise avec l'activation du monomère et la formation d'un centre actif sur une molécule de monomère. Dans la phase de propagation, la croissance de la macromolécule est obtenue par des réactions successives des molécules de monomère sur le centre actif. Les molécules de monomère intègrent la chaîne macromoléculaire une par une. La phase de terminaison consiste en la désactivation de la chaîne en pleine croissance avec la perte du centre actif. Le

transfert du centre actif de l'extrémité de la chaîne en croissance à une petite molécule T (monomère, solvant, impureté, agent de transfert ajouté dans le milieu...) avec terminaison de la chaîne polymère au stade « Mi » présente la phase du transfert. Cette phase peut se faire sur le polymère ou sur une liaison de la même macromolécule (transfert intramoléculaire), ainsi que sur une liaison d'une autre macromolécule déjà désactivée (transfert intermoléculaire). Dans les deux cas il y a la formation d'un branchement [37].

Concernant le PVC, sa synthèse est réalisée par polymérisation radicalaire où la croissance du polymère a lieu par addition des molécules de monomère vinylique en fin de chaîne. Cette réaction est amorcée par la chaleur, rayonnement ultraviolet, ou des molécules génératrices (AIBN) de radicaux libres *via* une rupture homolytique conduisant à des radicaux libres qui vont se lier de manière covalente aux molécules de monomère.

La réaction de propagation pour les monomères vinyliques a majoritairement lieu par l'enchaînement des unités monomères tête-à-queue à cause de l'encombrement stérique au niveau du carbone porteur du groupe latéral et des effets électroniques (inductif ou résonance) présentées en **Figure 5**. La phase de terminaison se fait par combinaison ou dismutation



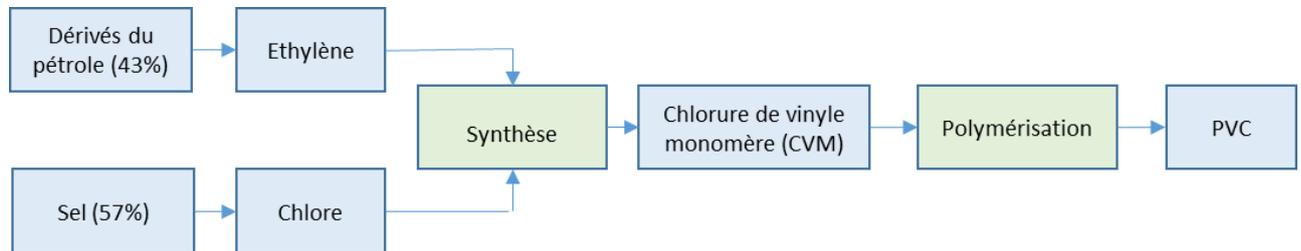
**Figure 5. Phase de terminaison par combinaison ou dismutation [37].**

### 1.1.6 Fabrication industrielle du PVC

Au niveau industriel, le PVC est obtenu *via* la polymérisation d'addition radicalaire du chlorure de vinyle monomère (CVM) (**Figure 6**). La réaction de l'éthylène (provenant de l'industrie

pétrochimique) avec du dichlore fournit du dichlorure d'éthylène (DCE ou EDC ; Ethylene dichloride en anglais).

La décomposition thermique du DCE produit du CVM et de l'acide chlorhydrique (HCl) [38].



**Figure 6. Fabrication industrielle du PVC [36].**

Au Japon, le processus combiné de l'éthylène et de l'acétylène pour la production de CVM a été introduit à la fin des années 60. Une troisième technique (1970) pour la synthèse du CVM est le procédé mixte de gaz de naphta (gaz de pétrole liquéfié). Il s'agit de faire réagir les gaz mixtes d'éthylène et d'acétylène avec HCl afin de convertir l'acétylène en CVM. Ensuite, l'éthylène restant réagit avec HCl pour former le DCE. Les réactions ci-dessous montrent un exemple de fabrication du monomère CVM (**Figure 7**) [38,39].



**Figure 7. Fabrication du chlorure de vinyle monomère (CVM) selon le procédé mixte de gaz de naphta (gaz de pétrole liquéfié) [38].**

Les exemples précédents montrent que la fabrication du PVC a beaucoup évolué au cours des dernières décennies. La **Figure 8** illustre un exemple de fabrication moderne du PVC utilisant le procédé mixte de gaz de naphta [40]. Le pétrole ou le gaz naturel produit tout d'abord de l'éthylène. Sur le côté droit de cette représentation, on visualise également que le chlore et l'hydroxyde de sodium sont produits par électrolyse du sel.

La réaction entre l'éthylène et le chlore donne ainsi du dichlorure d'éthylène (DCE) qui dans une seconde étape se transforme en chlorure de vinyle monomère (CVM).

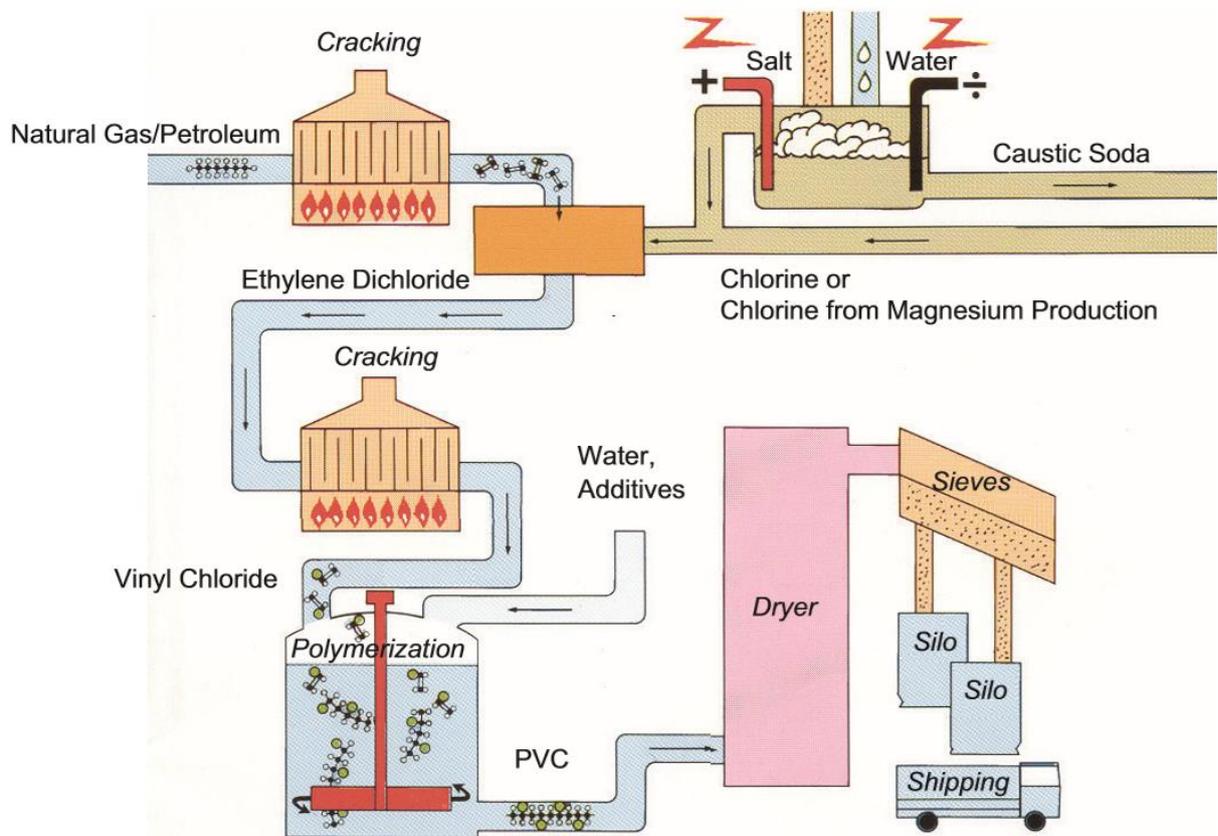


Figure 8. Représentation schématique de la fabrication moderne du PVC [40].

Une fois le CVM obtenu, il est ensuite polymérisé dans un autoclave sous pression, avec l'addition d'initiateurs et d'autres additifs pour former du PVC. L'initiateur forme des radicaux  $R^*$  qui commencent la réaction de polymérisation. Le processus est schématisé dans la Figure 9.

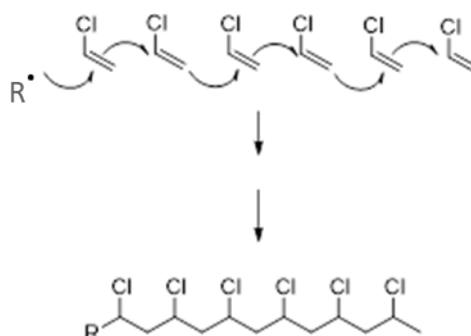


Figure 9. Polymérisation du chlorure de vinyle monomère (CVM) en PVC [40].

Selon le milieu dans lequel est faite la réaction, on distingue :

- La polymérisation en masse (sans solvant et sans diluant)
- La polymérisation en solution (présence d'un solvant ou d'un diluant)
- La polymérisation en milieu dispersé qui regroupe plusieurs procédés tels que la polymérisation en suspension, émulsion, ou dispersée.

Le PVC est fabriqué principalement avec la polymérisation en suspension, en émulsion ou en masse.

### 1.1.7 Propriétés physico-chimiques du PVC

A l'état solide, le PVC est amorphe (comme le verre) et polaire en raison de la présence de l'atome de chlore dans son monomère vinylique ( $\text{CH}_2=\text{CHCl}$ ). Les caractéristiques permettant de distinguer les matières premières de PVC les unes des autres reposent sur les différences de traitement et des propriétés physiques de leurs composés telles que les masses moléculaires, la taille des particules, les impuretés ou encore la composition polymérique. Le **Tableau 2** présente quelques caractéristiques physico-chimiques du PVC.

**Tableau 2. Propriétés physico-chimiques du PVC pur.**

PVC	
Formule	$\left[ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\   \quad   \\ -\text{C}-\text{C}- \\   \quad   \\ \text{H} \quad \text{Cl} \end{array} \right]_n$
Numéro CAS	9002-86-2
Monomère	$\text{CH}_2=\text{CHCl}$
Masse moléculaire	37,000-214,000 dalton, g/mol
Température de polymérisation	55-73°C
Température de transition vitreuse ( $T_v$ )*	58-75°C
Taille des particules	S-PVC 50-200 $\mu\text{m}$ E-PVC 1-2 $\mu\text{m}$ M-PVC 5-10 $\mu\text{m}$
Densité à 20°C	1,37-1,53 g $\text{cm}^{-3}$ ; 1,373 g $\text{cm}^{-3}$ (amorphe) 1,53 g $\text{cm}^{-3}$ (cristalline)
Température de fusion	185-195°C
Température d'ébullition mesurée par DSC (Differential Scanning Colorimetry)	103-230; 400°C

\*température à laquelle la matière passe d'un état caoutchouteux à un état vitreux, solide (rigide)

### 1.1.8 Utilisation des additifs dans le PVC

Les additifs (adjuvants) sont destinés à modifier les propriétés physiques (mécaniques, thermiques) et les propriétés chimiques des polymères. Ils sont classés selon leurs propriétés principales tels que [39] [40]:

- *Les stabilisants thermiques* contenant des stabilisateurs de base sans métal (dihydropyridines, aminocrotonates), les savons métalliques (des stéarates de plomb, de cadmium, de baryum, de calcium et de zinc), stabilisateurs d'étain et plomb. Les stabilisants comme les stéarates de calcium et de zinc, ainsi que l'ESBO (huile de soja époxydée) sont largement acceptés dans la formulation du PVC pour les applications médicales [39]
- *Les photostabilisants* (phénols, amines aromatiques)
- *Les lubrifiants* (acide stéarique, cires telle que la paraffine)
- *Les stabilisants de résistance au choc* (acrylonitrile-butadiène-styrène et caoutchouc nitrile)
- *Les co-stabilisateurs* (butylhydroxytoluène (BHT), bisphénol A (BPA))
- *Les retardateurs de flamme* (alumine trihydratée)
- *Les agents gonflants* (azodicarbonamide (AZO), dinitrosopentaméthylènetétramine (DNPT) et bicarbonate de sodium)
- *Les colorants ou pigments* (dioxyde de titane)
- *Les agents de couplage* (poly[méthylène (polyphénylisocyanate)]) (PMPPIC)
- *Les plastifiants* (phtalate, adipates, trimellitates, cyclohexane dicarboxylates...)

Le PVC peut donc avoir des caractéristiques très différentes en fonction de la quantité d'additifs ajoutés. Dans le paragraphe suivant, nous allons plus particulièrement détailler la notion de plastifiant, composé organique qui permet d'assouplir plus ou moins le PVC en fonction de la quantité ajoutée.

## 1.2 Les plastifiants

### 1.2.1 Généralités

Un plastifiant est un additif qui augmente la souplesse du polymère. La norme ISO 472 (1988) appliquée aux plastiques lui accorde la définition suivante : « substance de volatilité faible ou négligeable, incorporée à un plastique, destinée à abaisser son intervalle de ramollissement, faciliter sa mise en œuvre et augmenter sa flexibilité ou son extensibilité » Les plastifiants doivent satisfaire à plusieurs autres exigences :

- Bonne compatibilité avec le PVC
- Absence de couleur visible
- Odeur non significative
- Volatilité acceptable
- Bonne performance à basse température

- Applicable à un large éventail de différentes technologies de traitement (mélange, extrusion, calandrage, plastisols, moulage par injection...)
- Utilisable dans une large gamme d'applications de produits
- Longue durée de conservation
- Approbation selon la loi ou les normes si utilisé pour des applications spécifiques (jouets et objets de puériculture, domaines alimentaire et médical)
- Bon rapport qualité-prix [40].

### 1.2.2 Historique

Les plastifiants sont utilisés depuis longtemps par l'homme. La poterie est probablement le premier produit qui utilise l'eau comme plastifiant (exemple : 550 avant J-C dans l'art de la poterie grecque) [41]. La préparation du premier polymère « artificiel », la nitrocellulose (estérification de la cellulose avec un mélange sulfonitrique), par C. Schönbein et Bottgen (1846) marque également l'histoire récente des plastifiants. Cette technique n'a pas été brevetée. Le premier brevet Américain est obtenu par Turkington VH en 1924 par polycondensation du formaldéhyde et du phénol (formation des phénoplastes) [41]. Un deuxième brevet est également obtenu la même année concernant l'utilisation des phosphates aromatiques pour la formation de celluloid (matière composée essentiellement de nitrate de cellulose et de camphre) [42]. Le brevet de Friedrich Klatte concernant la fabrication du PVC relate également le procédé de plastification du PVC avec des plastifiants [34]. En 1933, Kyrides a breveté l'utilisation du **DEHP** pour la plastification de la nitrocellulose, de l'acétylcellulose et d'autres plastiques [42]. Deux mois plus tard, le brevet de Semon portant lui aussi sur la plastification du PVC avec du **DEHP** est publié [42]. Dès lors, le **DEHP** a révolutionné le concept de plastifiant et est rapidement devenu le plastifiant le plus important en termes de volume dans l'industrie du PVC. Après deux décades d'utilisation des plastifiants pour les emballages alimentaires, les plastifiants sont apparus dans les dispositifs médicaux en PVC plastifié.

### 1.2.3 Données économiques

En 2011, 6,4 millions de tonnes de plastifiants ont été utilisés dans le monde [43]. Seulement 5 % de cette quantité n'est pas consommée pour le processus de plastification du PVC. En Europe, environ 1 million de tonnes de plastifiants est utilisé. [43]. L'Amérique du Nord et du Sud (0,8, et 0,3 million de tonnes respectivement) n'utilisent au total que légèrement plus de plastifiants que l'Europe, mais l'Asie-Pacifique consomme 3,5 millions de tonnes [41, 44]. Malgré les lois européennes récentes concernant la restriction d'utilisation du **DEHP**, ce plastifiant représente encore 37,1 % du marché mondial et continue d'être le produit le plus usité en Chine, en Inde et dans d'autres pays d'Asie, au Moyen-Orient, en Afrique et en Amérique latine. De ce fait, ces restrictions d'usage en Europe n'empêchent pas la présence sur le marché européen d'articles importés contenant du **DEHP** [44]. Les autres plastifiants comme le **DEHA**, le **DEHT**, le **DINCH**, le **TOTM** sont produits à hauteur de 10 à 100 milles tonnes par an [45].

### 1.2.4 Rôle des plastifiants dans le PVC et mécanisme d'action

Les plastifiants ajoutés au PVC peuvent jouer leur rôle pendant le traitement du PVC ou bien au niveau du produit fini. En effet, pendant le traitement du PVC, l'utilisation de plastifiants peut permettre d'améliorer la lubrification interne et la dispersion de la charge et des pigments, réduire les frottements internes et l'adhérence aux surfaces métalliques, diminuer la température de traitement et la viscosité à l'état fondu.

Dans le produit fini en PVC, les plastifiants peuvent conférer de la souplesse, augmenter l'élongation, la flexibilité et la résistance aux chocs, l'aptitude du produit pour des applications à basse température, la mobilité de la chaîne, la cristallisation, réduire la température de transition vitreuse et la résistance à la traction. Ils améliorent également la compatibilité avec d'autres polymères, les propriétés antistatiques, la résistance à la flexion, la ténacité, la brillance et les qualités de surface, la performance de glissement, l'adhérence sur des surfaces similaires et/ou différentes ou encore diminuer la fragilité du PVC [40,41].

### 1.2.5 Classification des plastifiants utilisés dans les DM en PVC plastifié

Différentes molécules chimiques et biochimiques sont utilisées pour «plastifier» le PVC dans les DM [39–41,45] tels que les phtalates, les téréphtalates, les trimellitates, les esters d'acides aliphatiques dicarboxyliques (adipates), les époxydes et les phosphates comme l'illustre la Figure 10.

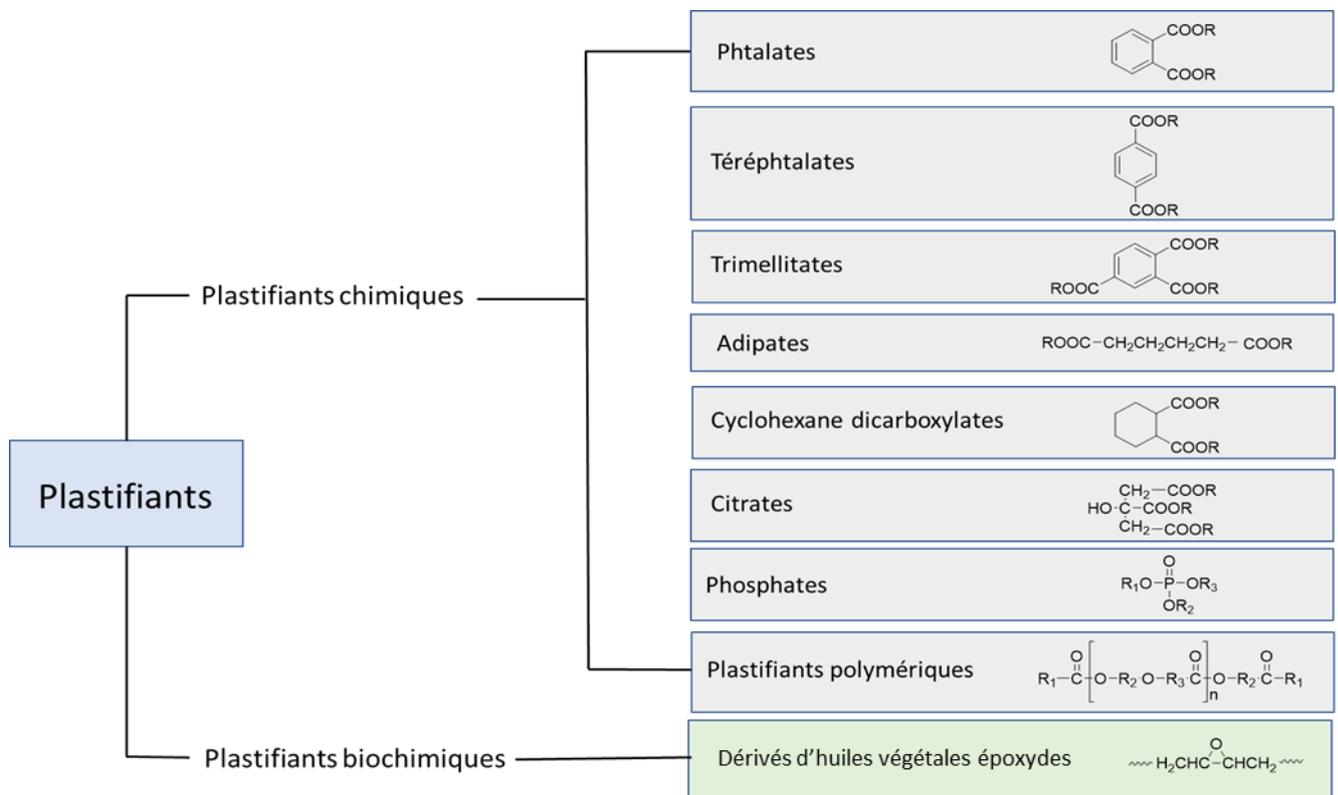


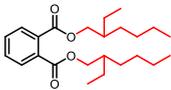
Figure 10. Classement des plastifiants utilisés dans le PVC plastifié (R est une chaîne aliphatique) [42].

### 1.2.6 Utilisation du DEHP dans les DM

Le **DEHP** a été le plastifiant le plus utilisé dans les DM en PVC pendant les 50 dernières années [46]. D'un point de vue chimique, le **DEHP** est un phtalate dérivé de l'acide phtalique possédant un noyau benzénique et deux groupements esters ayant la même chaîne alkyle (2-éthylhexanol) placée en position ortho.

L'identification et la structure du **DEHP** sont présentées dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3. Structure et identification du DEHP.**

Plastifiant	<b>DEHP</b> Di-(2-ethylhexyl) phtalate
Structure chimique	
EC / List name*	phtalate de bis(2-éthylhexyle)
Nom IUPAC**	1,2-bis(2-ethylhexyl) benzene-1,2-dicarboxylate
N° CAS***	117-81-7
N°EINECS**** ou EC / List no.	204-211-0

\*EC / List name (European Community name / List name assigned by ECHA)

\*\*IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)

\*\*\*N°CAS (Chemical Abstracts Service)

\*\*\*\*N°EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances) or EC / List no. (European Community number / List number assigned by ECHA)

La forte utilisation du **DEHP** dans les DM a conduit la communauté scientifique à étudier les risques pour l'homme *via* ce mode d'exposition. Il a ainsi été démontré que du fait de la liaison non covalente du **DEHP** avec le PVC, il avait ainsi la capacité de migrer du DM vers le contenu puis d'entrer en contact direct avec le patient [7] [4]. Au regard des risques encourus par le patient, le **DEHP** est progressivement remplacé par des plastifiants alternatifs proposés par les experts du SCENIHR.

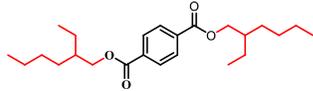
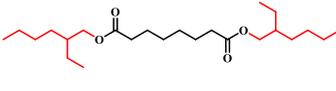
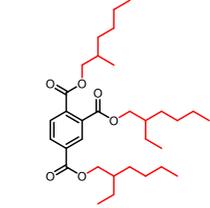
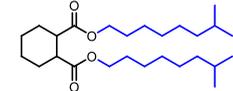
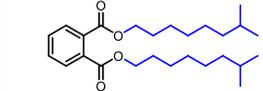
Le nombre de DM plastifiés au **DEHP** diminue mais ce dernier reste encore présent dans de nombreux DM. Selon l'étude menée par l'ANSM en 2016 concernant le contrôle du marché des DM en PVC plastifié annoncés sans **DEHP**, il s'avérait encore présent dans les tubulures de perfusion, de nutrition entérale, parentérale mais aussi celles en contact direct avec le sang (circuits de circulation extracorporelle, poches de sang) [47]. Parmi les 62 DM analysés par l'ANSM, 11 DM contenaient plus de 0,1 % (masse de plastifiant /masse de PVC plastifié) de **DEHP** [48].

En attendant le remplacement complet du **DEHP** par des plastifiants alternatifs ne présentant pas de risques pour la santé humaine, la France a décidé de fixer les niveaux de concentration en **DEHP** dans les DM en PVC plastifié, en-dessous desquels il présente un risque potentiel pour l'homme sur la base de l'article L. 5214-1 du code de santé publique selon l'arrêté du 13 avril 2017. L'arrêté interdit l'utilisation de tubulures dont le taux de DEHP dépasse les 0.1% (en masse/masse de matière plastifiée) dans les services de pédiatrie, de néonatalogie et dans les maternités. Il laisse cependant une tolérance jusqu'au 22 Juillet 2021 pour les DM de circulation extracorporelle, de dialyse, de collecte, préparation et transfusion du sang, ainsi que ceux d'assistance respiratoire qui pourront contenir jusqu'à 40% de **DEHP** jusqu'à ce que les industriels aient trouvé des alternatives. A terme, si l'on se réfère au règlement (UE) 2017/745 du Parlement Européen et du conseil Européen du 5 avril 2017 relatif aux DM modifiant la directive 2001/83/CE [6], le **DEHP** ne devra plus excéder 0,1 % (masse de plastifiant/masse de matière plastifiée) dans tous les DM utilisés dans l'Union Européenne. Les termes du règlement européen doivent normalement entrer en application à compter du 26 Mai 2020.

#### **1.2.7 Plastifiants alternatifs au DEHP**

Les plastifiants alternatifs les plus utilisés dans les DM en France sont le **DEHT**, le **DEHA**, le **TOTM**, le **DINCH** et le **DINP** [4,49] recensés dans le **Tableau 4**.

**Tableau 4. Structure et identification des plastifiants alternatifs.**

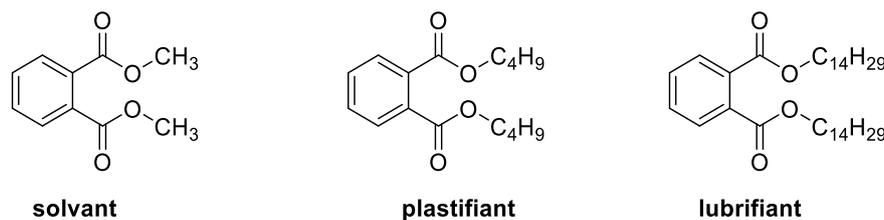
Plastifiant alternatif	<b>DEHT</b> Di-(2-ethylhexyl) terephthalate	<b>DEHA</b> Di-(2-ethylhexyl) adipate	<b>TOTM</b> Tri-octyltrimellitate	<b>DINCH</b> Di(isononyl)-cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid	<b>DINP</b> Di-(isononyl) phthalate
Structure chimique					
EC / List name*	Bis(2-ethylhexyl) terephthalate	Bis(2-ethylhexyl) adipate	Tris(2-ethylhexyl) benzene-1,2,4-tricarboxylate	1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 1,2-diisononyl ester	1,2-Benzenedicarboxylic acid, 1,2-diisononyl ester
Nom IUPAC**	1,4-bis(2-ethylhexyl) benzene-1,4-dicarboxylate	1,6-bis(2-ethylhexyl) hexanedioate	1,2,4-tris(2-ethylhexyl) benzene-1,2,4-tricarboxylate	Diisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate	Bis(7-methyloctyl) benzene-1,2-dicarboxylate
N° CAS***	6422-86-2	103-23-1	3319-31-1	166412-78-8	68515-48-0 28553-12-0
N°EINECS or EC / List no. ****	229-176-9	203-090-1	222-020-0	605-439-7	271-090-9

\*EC / List name (European Community name / List name assigned by ECHA); \*\*IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry); \*\*\*N°CAS (Chemical Abstracts Service);

\*\*\*\*N°EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances) or EC / List no. (European Community number / List number assigned by ECHA)

Tous les plastifiants alternatifs possèdent deux groupements carboxylates avec une chaîne alkyle de longueur identique, excepté le **TOTM** qui en comptabilise trois. Ils se différencient par rapport au noyau (benzénique pour le **DEHT**, le **TOTM** et le **DINP** ou cyclohexane pour le **DINCH**) ou par la chaîne alkyle (2-éthylhexanyle pour le **DEHT**, le **DEHA**, le **TOTM** ou isononyle pour le **DINP** et le **DINCH**).

Les plastifiants peuvent avoir des structures chimiques similaires avec celles des solvants et des lubrifiants. La différence repose uniquement sur la longueur de la chaîne hydrophobe. La **Figure 11** illustre la différence de la longueur de la chaîne hydrophobe de plastifiant (DBP, dibutyl phtalate) par rapport à un solvant et un lubrifiant.



**Figure 11. Différence entre un plastifiant et un solvant ou lubrifiant [40].**

En général, si le nombre de carbone augmente, la volatilité de la molécule chimique diminue, la température de solubilité augmente, la compatibilité augmente (après avoir atteint un maximum, diminue à nouveau) et les propriétés lubrifiantes augmentent [40]. Au vu des structures des plastifiants alternatifs, le **TOTM** est moins volatil (3 chaînes aliphatiques de 8 carbones) que le **DINCH**, le **DINP**, le **DEHT** et le **DEHA**. Il est ainsi le plus compatible avec le PVC grâce à son poids moléculaire élevé et son encombrement stérique important.

### 1.2.8 Propriétés physico-chimiques du DEHP et des plastifiants alternatifs

Les propriétés physico-chimiques des plastifiants utilisés dans les DM et les conditions d'utilisations cliniques des DM ont un impact très important dans la migration des plastifiants des DM vers les fluides en contact. Le **Tableau 5** résume les propriétés physico-chimiques du **DEHP** et de ses plastifiants alternatifs [4,40,45].

**Tableau 5. Propriétés physico-chimiques des principaux plastifiants utilisés dans les DM.**

DEHP et les plastifiants alternatifs	DEHP	DINP	DINCH	TOTM	DEHA	DEHT
Masse moléculaire (g/mol)	390,56	418,61	424,65	546,78	370,57	390,56
Masse volumique (g/mL)	0,986	0,972	0,949	0,988	ND	ND
Point de fusion (°C)	-50	-54	-54	-43	-67,8	<-67,2
Point d'ébullition (°C)	385	424	245	283	214	363
Pression de vapeur (Pa à 20°C)	$3,4 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-5}$	$<2,8 \times 10^{-4}$ à 100°C	$8 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-3}$
Constante diélectrique (F/m)	5,18	4,62	4,50	ND	ND	ND
Log K <sub>ow</sub> (mesuré à 25°C)	7,45	9,52	10,0	8,00	8,39	8,3
Indice de réfraction (à 20°C)	1,485	1,486	1,483	ND	ND	ND
Indice d'acide (théorie, mg KOH/g)	< 1	< 1	< 1	< 1	ND	ND
Indice de saponification (théorie, mg KOH/g)	287	268	264	308	ND	ND
Paramètre de solubilité	8,83	8,77	8,70	ND	ND	ND
Solubilité dans l'eau (mg/L mesuré à 25°C)	$2,49 \times 10^{-3}$	$1,74 \times 10^{-5}$	$8,8 \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^{-3}$	$5,45 \times 10^{-3}$	$2,39 \times 10^{-4}$
Température de gélification (°C) *	109	118	ND	ND	ND	ND
Perte pendant le chauffage (%)**	4,5	2,1	ND	ND	ND	ND
Extractibilité dans l'eau (%)***	0,01	0,07	ND	0,0	0,10	0,09
Extractibilité dans kérosène (%)****	44,3	77	ND	> 70	> 70	71
Pureté (%)	99,7	> 99,5	> 99,5	≥ 98,4	> 99	98,5
Impuretés (%)	≈ 0,5	≈ 0,2	< 0,5	≈ 0,42	0,01-0,02	< 2

\*La température de gélification est mesurée comme la température où l'absorption rapide du plastifiant par la résine de PVC en suspension est observée. La température est augmentée de 2 ° C / min [40] (Michael Schiller, 2015) ; \*\* Perte de poids après un jour à 87 ° C de charbon suractivé pour PVC plastifié contenant 67 % de plastifiant [40] (Michael Schiller, 2015) ; \*\*\* Perte de plastifiant d'une couche de PVC de 1 mm contenant un plastifiant à 40% lors d'une extraction avec de l'eau à 50 ° C pendant 24 heures [4] (scenih\_r\_o\_047) ; \*\*\*\* Perte de plastifiants d'une feuille de PVC de 1 mm contenant 40% de plastifiant lors d'une extraction au kérosène à 23 ° C pendant 24 heures [4] (scenih\_r\_o\_047) ; ND : Données non disponible

Les propriétés physico-chimiques influençant la migration des plastifiants sont la polarité et la solubilité (**Tableau 5**). Les plastifiants ayant un Log  $K_{ow}$  (ou Log P) (coefficient de partage d'une molécule entre *n*-octanol et eau) positif migreront vers les liquides lipophiles et les molécules ayant un Log  $K_{ow}$  négatif migreront préférentiellement vers des solutions hydrophiles. Selon les valeurs des Log Kow (**Tableau 5**), le **DEHP**, le **DINP**, le **DINCH**, le **TOTM**, le **DEHT** et le **DEHA** sont susceptibles de migrer vers les liquides lipophiles et beaucoup moins vers les solutions hydrophiles. Une fois que le plastifiant migre vers l'interface de la matrice du DM, il entre en contact avec le liquide contenu dans le DM. A ce stade la solubilité du plastifiant dans le liquide devient un élément important influençant la migration. Les plastifiants alternatifs sont tous solubles dans les milieux lipidiques mais ils peuvent être plus au moins solubles dans des solutions aqueuses. Par exemple le **DINCH** est moins soluble dans l'eau (0,020 mg/L) grâce à sa chaîne latérale de 9 atomes de carbone que le **DEHP** (0,285 mg/L) ayant une chaîne latérale de 8 atomes de carbone [50].

En se basant sur la polarité et la solubilité des plastifiants, le **TOTM** en contact avec des liquides à composante lipidique devrait migrer davantage que le **DEHP**. Mais l'étude de Rie Ito démontre que le **TOTM** migre beaucoup moins car l'encombrement stérique et le haut poids moléculaire du **TOTM** (**Figure 5**) limitent sa migration [11]. La volatilité du plastifiant peut également influencer la migration des plastifiants. Selon les valeurs de la pression de vapeur des plastifiants (**Tableau 5**), le **DEHT** est plus volatil que le **DEHA**, le **DINCH**, le **DEHP**, le **TOTM** (par ordre décroissant), mais il migre moins que le **DEHA** en raison de sa structure. Les autres paramètres physico-chimiques des plastifiants sont la pureté, l'indice de saponification et l'indice d'acidité (l'indice de saponification représente la masse (en mg) d'hydroxyde de potassium nécessaire pour saponifier un gramme d'ester et l'indice d'acidité constitue la masse (en mg) d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser l'acidité libre contenu dans un gramme). Ces deux indices déterminés pour des composés purs, permettent la mesure indirecte de la masse molaire de la molécule.

En résumé, les propriétés physico-chimiques des plastifiants influençant leur migration à partir du PVC sont la polarité, la solubilité, la volatilité, la masse moléculaire et la structure même de la molécule. La migration de chaque plastifiant va donc être variable en fonction de la nature des fluides en contact, de la composition du PVC (autres additifs notamment) et du contexte environnemental (température, débit...).

## 1.2.9 Synthèse et fabrication industrielle des plastifiants

### 1.2.9.1 Généralités

En général, les phtalates utilisés dans les DM comme le DEHP, DINP sont synthétisés par les réactions d'estérifications d'un anhydride ou d'un acide organique en présence d'un alcool aliphatique [41]. Les autres plastifiants contenant deux fonctions ester peuvent être produites avec les réactions de transestérification selon l'équation suivante :

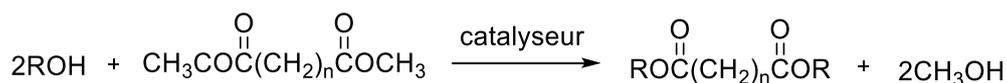


Figure 12. Synthèse des plastifiants diester [41] (page 73).

La synthèse des réactifs (l'anhydride, acide organique, alcool...) utilisés dans la synthèse des plastifiants proviennent des différents sources [42]. Par exemple, l'anhydride phtalique utilisé dans la synthèse du DEHP et du DINP, est un produit de l'oxydation catalytique du naphthalène ou de l'ortho-xylène [41].

Pendant la fabrication industrielle du **DEHP**, l'anhydride phtalique est stocké dans un réservoir chauffé avec de la vapeur d'eau pour maintenir l'anhydride phtalique brut à l'état liquide. Ensuite l'anhydride phtalique est distillé à travers des colonnes de fractionnement. Le produit fini subit l'estérification. Les conditions de réaction sous lesquelles l'estérification se produit peuvent varier considérablement. La réaction se déroule très lentement à température ambiante, mais assez rapidement à des températures élevées. Environ 99 % des acides ou des anhydrides sont convertis en ester en quelques heures. Pour faciliter la réaction d'estérification, il est souhaitable que l'eau formée pendant l'estérification soit éliminée au cours de la réaction sous forme d'azéotrope. Dans la production commerciale des plastifiants ayant des fonctions esters tels que les phtalates, les adipates et les trimellitates, des conversions supérieures à 99% sont souhaitées. La partie de l'acide ou de l'anhydride d'acide n'ayant pas réagi est éliminé sous la forme d'un sel soluble dans l'eau [41]. Les plastifiants alternatifs aux **DEHP** sont fabriqués par la même voie synthétique que celle du **DEHP**. La **Figure 13** résume la fabrication (synthèses) industrielle des plastifiants alternatifs [51].

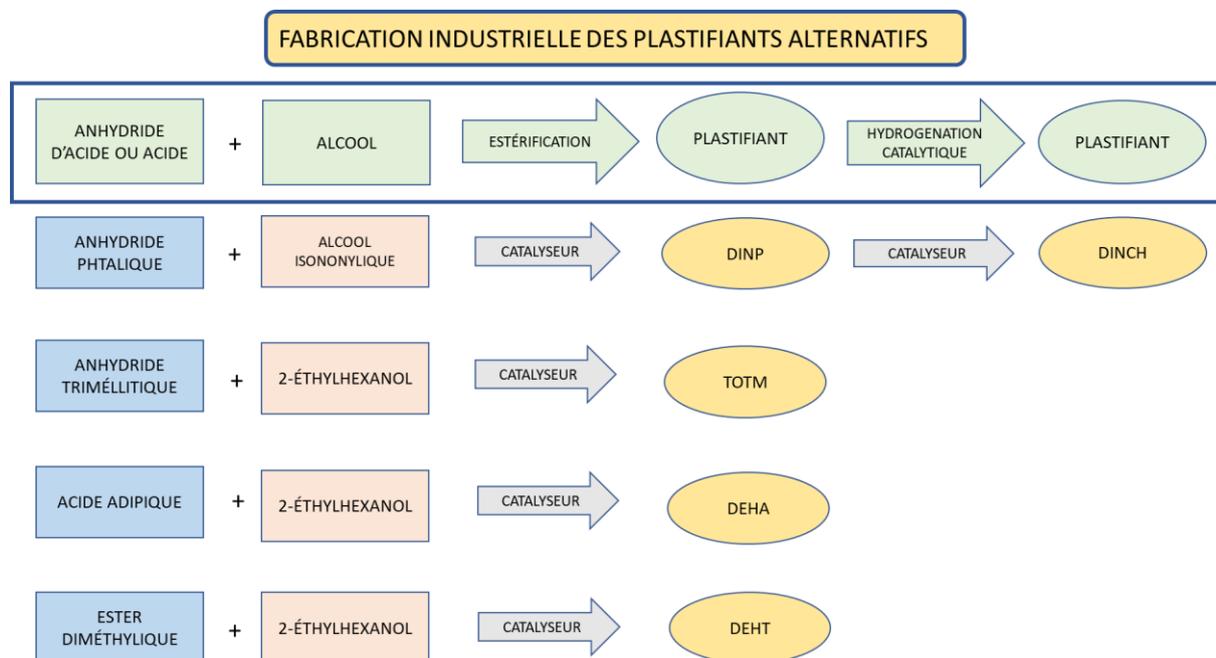


Figure 13. Fabrication industrielle des plastifiants alternatifs [51].

Seul le **DINCH** est produit par hydrogénation catalytique du **DINP** en présence d'un catalyseur [51].

### **1.3 Applications médicales du PVC plastifié**

#### **1.3.1 Généralités**

Environ 30 000 tonnes de PVC plastifié par an sont utilisées pour les applications médicales en Europe dans le cadre de DM stériles ou non stériles [4]. La plus grande proportion (>95 %) du PVC plastifié de qualité médicale est destinée à la fabrication des tubulures flexibles et des gants médicaux [4].

Les DM stériles en PVC plastifié sont [49]:

- Les tubulures pour perfusion, transfusion ou nutrition artificielle (entérale ou parentérale)
- Les circuits de type CEC (Circulation Extracorporelle), ECMO (de l'anglais, Extracorporeal Membrane Oxygenation) ou les lignes d'hémodialyse
- Les canules (veineuses, artérielles, aortiques, trachéotomie)
- Les sondes telles que les sondes d'aspiration endotrachéales
- Les poches (de sang, de recueil d'urine)
- Les cathéters ombilicaux
- Les tubulures d'oxygénothérapie (circuits des respirateurs)

Les DM non stériles en PVC plastifié sont [4]:

- Les masques et lunettes nasales,
- Les gants médicaux

Les DM peuvent contenir:

- Des plastifiants à des taux définis par la réglementation. La Pharmacopée Européenne mentionne les plastifiants autorisés. Le règlement européen 2017/745 relatif aux dispositifs médicaux demande à ne pas dépasser 0,1% (fraction massique, m/m) d'additifs classés CMR 1a ou 1b et présentant des effets perturbateurs endocriniens avérés.
- Des plastifiants à l'état de traces ou en dessous de 0,1%. Selon le règlement REACH [52] les pourcentages des plastifiants en dessous de 0,1 % (fraction massique, m/m) sont considérés comme des contaminants dans le DM.

#### **1.3.2 Fabrication des DM en PVC plastifié**

La transformation du PVC en un produit fini (DM dans notre cas) fait appel à plusieurs techniques comme le soufflage, le calandrage, le moulage par compression, le moulage par injection, l'enduction et l'extrusion. Ces techniques sont effectuées entre 180-200°C [41].

L'extrusion est le procédé le plus utilisé dans la fabrication des DM en PVC (conception des tubulures). Elle permet de transporter, fondre, malaxer, plastifier, comprimer la matière thermoplastique dans une extrudeuse à l'aide d'une vis de plastification. Pendant ce procédé, le PVC brut sous forme des mélanges secs ou de pastilles, est ajouté dans la cavité de l'extrudeuse. La machine fait chauffer les pastilles à une température donnée afin d'obtenir une pâte de plastique homogène et fondue. La vis (sans fin) tourne et force la pâte de plastique en fusion à s'avancer sous pression, à travers la tête d'extrusion de la machine. La tête d'extrusion assure le transfert de la pâte vers la filière qui impose au produit final sa forme et son épaisseur [53]. La matière chaude subit des opérations diverses afin de lui donner la forme définitive: soufflage (films, corps creux) ou conformation (tubes profilés), ou encore calandrage (feuilles plastiques, enduction) [54]. Le processus d'extrusion se termine par refroidissement de la matière dans l'air, l'eau etc... Ce processus peut être également utilisé pour toutes les matières thermoplastiques [54].

Après la fabrication, de nombreux DM à usage unique en PVC plastifié subissent un processus de stérilisation afin d'assurer la sécurité sanitaire du patient en ne l'exposant pas à un risque d'infection. Plusieurs méthodes de stérilisation des DM existent (par irradiation, en présence d'oxyde éthylène...) [39]. Parmi toutes ces techniques, la stérilisation par oxyde d'éthylène gazeux est largement répandue pour les DM à usage unique [55]. Mais la stérilisation par irradiation commence de plus en plus à remplacer la stérilisation par oxyde d'éthylène. En effet, l'oxyde d'éthylène est une substance classée carcinogène de catégorie 1B et mutagène 1B selon le règlement européen N° 1272/2008 du 16/12/2008 (règlement dit « CLP ») relatif à la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances et des mélanges [5]. Au regard des risques, les fabricants utilisant des procédés de stérilisation des DM par oxyde d'éthylène devraient avoir une bonne maîtrise des résidus éventuels d'oxyde d'éthylène restant dans le DM.

### 1.3.3 Méthodes d'analyse des plastifiants dans les DM

La mise sur le marché des DM a été encadrée par la directive européenne 93/42/CEE, mais à partir 26 Mai 2020 c'est le règlement européen 2017/745 relatif aux dispositifs médicaux qui entre en vigueur. Le nouveau règlement impose les contrôles stricts sur les DM. Concernant les plastifiants utilisés dans les DM, la réglementation (chapitre II de l'Annexe I sur les Exigences générales en matière de sécurité et de performances), mentionne que la concentration en additifs doit être inférieure à 0,1% (fraction massique, m/m) pour les composés CMR1A ou CMR1B tels que le **DEHP** (classé toxique pour la reproduction de catégorie 1B selon le règlement (CE) n°1272/2008) [5] dans les DM, que lorsque cela est justifié conformément à la section 10.4.2 du Règlement [6]. La composition des plastifiants présents dans les DM en PVC plastifié doit donc être indiquée clairement sur l'étiquette du DM. Pour analyser la composition d'un DM, il existe plusieurs méthodes que nous allons détailler ci-après.

### 1.3.3.1 Les méthodes directes

Généralement, ce sont des méthodes très simples à réaliser et appropriées pour identifier les plastifiants mais elles ne sont pas sensibles au sens analytique du terme. On peut ainsi distinguer :

- **L'analyse thermogravimétrique** (en anglais, Thermogravimetric analysis ou TGA). La TGA pourrait être une technique facile et peu coûteuse pour obtenir des informations sur la quantité de plastifiant dans un DM en PVC plastifié sous réserve qu'il n'y ait qu'un plastifiant dans la composition du DM
- **La calorimétrie différentielle à balayage** (en anglais, Differential Scanning Calorimetry ou DSC) est principalement utilisée pour montrer la dégradation du polymère dans un DM (elle est basée sur la température de transition vitreuse ( $T_v$ ) du polymère). La méthode peut être utilisée également pour déterminer la présence de plastifiants dans une matrice PVC.
- **La résonance magnétique nucléaire** (en anglais, Nuclear magnetic resonance ou NMR) constitue l'un des plus puissants instruments de détermination de la structure des espèces organiques ou inorganiques. Elle a une bonne spécificité en raison de sa capacité à distinguer efficacement les isomères de constitution. Elle peut par exemple être utile dans le domaine des DM pour distinguer le **DEHP** de son isomère **DEHT**. Genay et al. utilisent la RMN pour identifier et quantifier le **DEHP**, le **DINP**, le **DINCH**, le **DEHA**, le **DEHT**, le **TOTM** et l'**ATBC** dans des DM [56].
- **La spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier** (en anglais, Fourier Transform-Infrared Spectroscopy ou FTIR) permet de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans une molécule en se basant sur les fréquences de vibration qui sont caractéristiques d'un groupement chimique dans une molécule étudiée. Une combinaison de spectromètres FTIR à haute sensibilité avec des accessoires ATR (Attenuated Total Reflectance) donne des niveaux faibles de bruit de fond, ce qui constitue un avantage dans la détection des concentrations à l'état de traces de **DEHP**. Deux bandes, une pour le polymère (C – H mode d'étirement à  $1426\text{ cm}^{-1}$ ) et l'autre pour le plastifiant (C – O – C mode d'étirement à  $1463\text{ cm}^{-1}$ ) sont caractéristiques pour identifier et quantifier (en calculant le ratio entre les deux absorbances) les plastifiants [57].
- **La spectroscopie Raman à Transformée de Fourier** (en anglais, FT-Raman spectroscopy) produit une lumière incidente à très haute énergie à partir d'une source UV, VIS ou NIR, ce qui permet d'obtenir des informations complémentaires sur la composition chimique, par exemple pour la dispersion inélastique de la lumière. Cela conduit à une sensibilité plus faible en raison d'un effet de diffusion plus faible. Les analyses qualitatives fiables des adipates (comme le **DEHA**) sont difficiles en raison des similitudes spectrales entre les molécules. Une analyse quantitative de ces composés n'est pas possible en raison de la sensibilité limitée de la méthode.

- **La spectroscopie par proche infrarouge** (en anglais, The near-infrared spectroscopy ou NIR). La région NIR est généralement considérée comme incluant des longueurs d'onde comprises entre 12 500 et 4 000  $\text{cm}^{-1}$  (proche infrarouge). Les bandes d'absorption proviennent des harmoniques et des combinaisons des groupes fondamentaux (mi-IR), principalement des liaisons C-H, N-H et O-H. La technique est utilisée par Saeki et al. pour distinguer différents plastifiants dans le PVC, y compris le **TOTM**, le **DEHA** et le **DINP** [58]. Mais, Saeki et al. démontrent que les spectres NIR sont insuffisants pour la discrimination des plastifiants appartenant au même groupe structural.
- **L'analyse directe en Spectrométrie de Masse en temps réel** (en anglais, The direct analysis in Real Time ou DART) permet l'insertion directe d'échantillons solides, tels que des échantillons de DM. Cette méthode permet l'identification des plastifiants présents dans un DM, avec les avantages d'éviter l'utilisation de solvants et de limiter le temps d'exécution. Elle est rapide pour l'identification des plastifiants présents dans les échantillons avant la détermination exacte. La technique est utilisée par Rothenbacher et al [57] pour réaliser un test de criblage rapide des plastifiants (comme le **DEHP**, le **DINP** ou le **DINCH**) dans les matériaux en PVC.

### 1.3.3.2 Les méthodes indirectes

Ces méthodes sont d'excellentes techniques d'analyses et elles reposent principalement sur la notion de chromatographie gazeuse ou liquide. Couplées avec des détecteurs, elles permettent ainsi de déterminer des quantités infinitésimales de plastifiants dans les DM [59–62].

Parmi toutes ces méthodes indirectes, on distingue notamment :

**La chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse** (en anglais, Gas Chromatography-Mass Spectrometry ou GC-MS) combine les performances de la CPG pour la séparation des composés d'un échantillon et celle de la spectrométrie de masse pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge. Cette technique permet d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances parmi lesquels des plastifiants présents en très petites quantités, voire à l'état de traces dans une grande variété d'échantillons comme des emballages alimentaires [63], l'eau [64], l'air à l'intérieur des habitations et crèches [65], poussière d'intérieur [61], matelas pour bébés [66] ou encore les jouets [67]. La GC-MS est souvent mentionnée dans l'analyse des plastifiants dans les DM [49,68].

Les points forts de cette technique sont :

- La sensibilité (capacité d'analyser les faibles concentrations des plastifiants)
- La spécificité (d'identifier avec précision tous les plastifiants dans un DM grâce aux ions spécifiques et de les quantifier dans un DM grâce à l'ion majoritaire)

- La sélectivité (distinguer un plastifiant en présence d'autres plastifiants ayant la même nature chimique)

Les points faibles de cette technique sont :

- La reproductibilité de la méthode qui oblige à calibrer régulièrement l'appareillage
- L'utilisation de solvants
- Le coût de l'appareillage

**La chromatographie liquide haute performance couplée à la détection ultraviolette ou CLHP-UV** (en anglais, High Performance Liquid Chromatography-UltraViolet detection ou HPLC-UV) consiste à injecter des composés sous forme liquide qui sont entraînés par une phase mobile (un ou plusieurs solvants d'élution) vers une colonne chromatographique dans laquelle s'effectue une séparation sélective. L'identification des produits élués se fait à l'aide d'un détecteur UV/visible. La CLHP-UV est une technique analytique facile à mettre en œuvre et peu onéreuse [69] Tsanta Radaniel et al (2014) l'ont utilisée pour la quantification du **DEHP** et du **DEHT**, mais la détection UV ne convient pas à la quantification des plastifiants tels qu'**ATBC** (LOQ 22,9µg/mL), et le **DINCH** (LOQ 52,8 µg/mL).

**La chromatographie en phase supercritique ou CPS** (en anglais, Supercritical fluid chromatography ou SFC) utilise un fluide supercritique, principalement du dioxyde de carbone comme phase mobile et permet parfois, en un court temps d'analyse, la séparation et l'identification d'un groupe de composés qui ne sont pas commodément manipulés par chromatographie gazeuse ou liquide. La SFC couplée au détecteur par diffusion de lumière par évaporation ELSD (de l'anglais evaporative light scattering detector) offre l'avantage d'une sensibilité plus uniforme pour la détection des analytes, quelles que soient leurs propriétés physico-chimiques. La SFC-ELSD est utilisée dans l'analyse de l'**ATBC**, du **DEHA**, du **DEHT** et du **TOTM** principalement présents dans les DM [70].

**La chromatographie liquide couplée au détecteur ELSD ou CLHP-ELDS**, (en anglais HPLC-ELDS High performance liquid chromatography- evaporative light scattering detector) permet également d'analyser certains plastifiants (l'**ATBC**, le **DEHA**, le **DEHT** et le **TOTM**). L'étude de Marie Lecoœur 2015 [71] démontre que HPLC-ELSD est plus précis que le SFC-ELSD mais les limites de quantification sont inférieures en utilisant le SFC-ELSD (les LOQ avec SCF-ELSD sont de 2,2-6,2 µg/mL et les LOQ avec HPLC/SFC sont de 0,7-4,6 µg/mL). Cependant les résultats de quantification des plastifiants dans le DM sont similaires avec les deux méthodes [71].

**La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ou CL-SM/SM** (en anglais, Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry ou LC-MS/MS) combine les performances de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances organiques (même en traces). Cette technique est peu utilisée pour doser les plastifiants dans les DM mais plutôt

pour des études de biomonitoring (dosage des métabolites des plastifiants dans les liquides biologiques) [72–74].

### 1.3.3.3 Techniques d'extractions des plastifiants à partir des DM

Les méthodes d'analyse indirectes nécessitent une extraction préalable des plastifiants de leur matrice. Pour préparer les échantillons à analyser, elles doivent être précises, reproductibles, robustes, simples, rentables, et sûres (solvants non toxiques et moins organiques). Les techniques appliquées à l'extraction de plastifiants à partir de DM plastifié en PVC sont les extractions solide-liquide, en espace de tête ou liquide-liquide [75].

Les principales techniques d'extraction solide-liquide sont :

- **La méthode Soxhlet** qui est une technique ancienne mais encore utilisée pour l'extraction des additifs des DM. Elle nécessite des volumes de solvants importants et un long temps d'extraction.
- **L'extraction avec un solvant à température ambiante** (contact direct du morceau de DM avec le solvant). Avec cette technique, les morceaux d'échantillons des DM sont mis en contact avec les solvants [49] et le mécanisme d'extraction est basé sur le processus de transport qui dépend de propriétés physiques (diffusion, viscosité, partage, solubilité et tension superficielle) du solvant. Le chloroforme est utilisé pour l'extraction du **DEHP**, **DEHT**, **DEHA**, **TOTM**, **DINCH** et **DINP** de la matrice PVC des DM car le rendement d'extraction est quantitatif [76].
- **La dissolution de polymères** consistant à solubiliser le polymère entier, c'est-à-dire le PVC, dans le tétrahydrofurane (THF) ou le diméthylacétamide (DMA) puis une reprecipitation du polymère (par exemple en utilisant de l'éthanol ou du méthanol) permet la séparation des plastifiants et du polymère [75]. C'est une technique facile, peu coûteuse, offrant de bons rendements d'extraction mais qui est longue.

Deux autres techniques nécessitant des appareils onéreux telles que **l'extraction par fluide supercritique** (en anglais, Supercritical Fluid Extraction ou SFE) et **l'extraction par micro-ondes** (en anglais, Microwaves extraction ou MAE) sont également utilisées. La SFE en ligne permet l'analyse de traces des plastifiants en PVC dans lesquels les analytes sont transférés directement aux instruments de dosage en utilisant le dioxyde de carbone supercritique comme solvant d'extraction. La SFE est utilisée dans l'analyse de contrôle de qualité de routine, comme démontré par Zhou et al [77]. L'extraction par micro-ondes (en anglais, Microwaves extraction ou MAE), nécessite une faible utilisation de solvants et consiste à chauffer le solvant ou l'échantillon d'extraction avec un rayonnement électromagnétique. La MAE est rapide et efficace, mais demande un équipement spécifique, coûteux et l'optimisation des conditions d'extraction reste compliquée. La technique est utilisée pour extraire le **DEHA**, le **DEHP** et le **DINP** des plastisols (pâte obtenue par dispersion colloïdale d'une résine synthétique poudreuse dans un plastifiant liquide) [78].

Quant à la **méthode d'extraction en espace de tête** (en anglais, Head-Space ou HS), elle est souvent couplée en ligne avec la chromatographie en phase gazeuse (HS-GC). Elle permet l'identification et la quantification des plastifiants, mais l'efficacité de l'extraction est affectée par la volatilité des plastifiants qui est l'inconvénient d'utilisation de HS-GS.

#### Ce qu'il faut retenir

Le PVC est un polymère synthétique linéaire et thermoplastique le plus utilisé dans le monde. Il existe principalement sous deux formes : rigide et flexible. Parmi d'autres domaines d'application, le PVC flexible est utilisé dans la fabrication de tubulures pour les DM. L'addition d'un plastifiant dans le PVC lui confère de l'élasticité et de la flexibilité. Les tubulures des DM plastifiées peuvent contenir jusqu'à 40% de plastifiant (g/100 g de PVC plastifié). Le **DEHP** constitue le plastifiant le plus utilisé dans le monde, représentant 37,1 % du marché mondial et est encore très utilisé dans les DM. Le fait que le **DEHP** ne soit pas lié de façon covalente avec la matrice du polymère, lui confère la capacité de migrer du DM vers le contenu, puis d'entrer en contact direct avec le patient et de l'exposer à des risques toxiques. Le **DEHP** est maintenant classé CMR1B (cancérogène, mutagène ou toxique pour la reproduction). Selon le nouveau règlement (entre en vigueur le 26 Mai 2020) la quantité de **DEHP** doit être inférieure à 0,1% (fraction massique, m/m) dans les DM. Au regard des risques les plastifiants alternatifs aux **DEHP** sont proposés tels que le **DINP**, le **DINCH**, le **TOTM**, le **DEHA** et le **DEHT**. D'autres additifs sont également ajoutés dans la composition du PVC plastifié à destination médicale, mais leur quantité reste très faible par rapport à celle des plastifiants.

Les DM stériles en PVC plastifié sont les tubulures de perfusion, de transfusion, de nutrition artificielle (entérale ou parentérale), les circuits de type CEC (Circulation Extracorporelle) ou ECMO (de l'anglais, Extracorporeal Membrane Oxygenation), les lignes d'hémodialyse, les canules (veineuses, artérielles, aortiques, trachéotomie), les sondes d'aspiration endotrachéales et les poches de sang ou de recueil urinaire, les dispositifs d'oxygénothérapie. Les DM non stériles en PVC plastifié sont par exemple les masques et lunettes nasales ou encore les gants médicaux.

Les plastifiants utilisés dans les DM peuvent être analysés directement dans le matériau (avec différentes techniques telle que TGA, DSC, NMR, FTIR NIR ou DART) ou indirectement (CPG, HPLC) *via* des méthodes d'extraction.

De même que le **DEHP**, les plastifiants alternatifs ne sont pas liés de façon covalente avec la matrice du polymère et ils possèdent ainsi la capacité de migrer du DM vers le contenu, puis d'entrer en contact direct avec le patient et de l'exposer à un éventuel risque toxique.

## 2. PROBLEMATIQUE DE LA MIGRATION DES PLASTIFIANTS A PARTIR DES DM ET EXPOSITION DES PATIENTS

### 2.1 La migration des plastifiants

La migration des plastifiants à partir de la matrice du PVC des DM est une problématique bien connue [4,8–13,20,27,74,79–84]. Lors du contact entre le DM et un « fluide » (biologique, médicamenteux, gazeux), les plastifiants peuvent diffuser du matériau vers le liquide ou le gaz et exposer le patient. Des études permettant d'évaluer qualitativement et quantitativement la migration des plastifiants à partir des DM plastifiés en PVC sont réalisées à l'aide de modèles essentiellement *ex vivo*.

#### 2.1.1 Etudes *ex vivo*

Le modèle *ex vivo* ou « hors du vivant » représente un type de modèle développé au laboratoire, hors de l'organisme (au contraire de *in vivo*). Ce modèle est souvent utilisé dans les études des migrations des plastifiants de DM pour sa facilité de mise en œuvre par rapport aux études *in vivo* (tout prélèvement de fluides médicamenteux ou biologiques pour effectuer un dosage de plastifiant va impliquer une modification de la prise en charge du patient et donc la mise en œuvre d'un protocole à soumettre au Comité de Protection des Personnes).

Pour effectuer des études de migration des plastifiants des DM en *ex vivo*, l'utilisation d'un simulant est nécessaire. Selon l'objectif de l'étude, le simulant utilisé peut-être le sang (cas d'un modèle de circulation extracorporelle), un solvant ou mélange de solvants (choisi de sorte qu'il soit représentatif des médicaments perfusés : en effet, vu la multiplicité de composition des médicaments perfusés, il est impossible de tester toutes les combinaisons). Le mélange eau/éthanol (50/50, v/v) est un simulant utilisé en agro-alimentaire pour évaluer la migration des additifs présents dans les emballages alimentaires en plastique. Il est représentatif des émulsions lipidiques [85]. Notre équipe utilise [27, 80] ce simulant pour imiter les médicaments à formulation lipidique pendant une perfusion *via* des tubulures en PVC. Par ailleurs, ce simulant respecte l'intégrité du PVC, ce qui permet son utilisation pour les tests de migration *ex vivo* avec ce polymère.

Les études de relargage des plastifiants selon les modèles *ex vivo* doivent être représentatives des situations cliniques rencontrées : transfusion sanguine (conservation du sang dans les poches), circulation extracorporelle (dialyse, ECMO) ou encore perfusion de médicament.

Le **Tableau 6** des pages suivantes résume différentes études *ex vivo* de migration des plastifiants des DM.

**Tableau 6. Etudes ex vivo de migration des plastifiants à partir des dispositifs médicaux.**

Dispositif médical	Plastifiant (% plastifiant g/100g de PVC)	Simulant	Temps de contact, température	Plastifiant relargué (concentration (µg/mL))			Référence
Poches de sang	DEHP	Sang humain	24h 4°C	2,3			Jaeger et al. 1972 [8]
Poches de sang	DEHP	Sang total humain conservé avec anticoagulant citrate (ACD)	21 j 5 °C	34,8-52,6			Sasakawa et al. 1978 [9]
		Sang total humain conservé avec anticoagulant citrate (CPD)	22 j 5 °C	32,6-46,1			
		Globules rouges conservés avec anticoagulant citrate (ACD)	21 j 5 °C	40,2-55,5			
		Plasma frais	1h	7,4			
Poche de sang	DEHP	Plasma pauvre en plaquettes	7 j	378 (DM stérilisés à vapeur), 362 (DM stérilisés oxyde d'éthylène), 275 (DM irradiés)			Dine et al. 1991 [10]
			14 j	432 (stérilisés à vapeur), 428 (stérilisé a l'oxyde d'éthylène), 356 (irradiés)			
Poches de sang	DEHP	Globules rouges concentrés	24h	12,74			Rael et al. 2009 [86]
			42 j	1691			
Tubulures de circulation extracorporelle (CEC)	DEHP	Sang de mouton	24 h 37°C	71,61			Eckert et al. 2016 [81]
	TOTM			0,07			
Tubulures de circulation extracorporelle (CEC)	TOTM (44,8 %)	Eau/éthanol 50/50 ; v/v	24 h 37°C	Statique	Bas débit	Haut débit	Fernandez-Canal et al. 2018 [80]
	DEHP (0,19 %)			15,9 (DEHP)	26,7 (DEHP)	6,9 (DEHP)	
	DEHT (0,19 %)			7,51 (TOTM)	11,4 (TOTM)	8,1(TOTM)	
	DEHA (0,27 %)			0,99 (DEHT)	<LOQ (DEHT)	1,1 (TOTM)	
				0,66 (DEHA)	0,8 (DEHA)	0,9 (DEHA)	
			6 j 37°C	Statique	Bas débit	Haut débit	
				68,1 (DEHP)	44,2 (DEHP)	33,6 (DEHP)	
				31,8 (TOTM)	39,0 (TOTM)	10,1 (TOTM)	
				1,1 (DEHT)	2,0 (DEHT)	0,5 (TOTM)	
				1,0 (DEHA)	1,6 (DEHA)	0,8 (DEHA)	
Tubulures (50 cm)	DEHP	Sang total humain	1 h	36,25			Greiner et al. 2012 [13]
			2 h	68,981			

Dispositif médical	Plastifiant (% plastifiant g/100g de PVC)	Simulant	Temps de contact, température	Plastifiant relargué (concentration (µg/mL))	Référence
Tubulures d'hémodialyse	DEHP	Sang bovin	4 h	1,7	Haishima et al. 2004 [82]
Tubulures de perfusion	TOTM	Glucose 5%	1 h 22°C	0,16	ITO et al. 2008 [11]
		Préparations intraveineuses lipophiles		5,6	
Tubulures de perfusion	DEHP	Emulsions intraveineuses lipidiques	24 h 22°C	65,8	Bagel et al. 2011 [12]
Tubulures de perfusion pour les enfants prématurés	DEHP	Emulsions intraveineuses lipidiques		46,5µg/ml	Faessler D et al. 2017 [87]
Tubulures de la perfusion	DEHP (31,1 %)	Eau/éthanol 50/50 ; v/v	24 h 40°C	230,6 (DEHP) 44,6 (DEHT) 169,5 (DINCH) 11,7 (TOTM)	Bernard et al.2015 [27]
	DEHT (28,0 %)		72 h 40°C	278,3 (DEHP) 45,4 (DEHT) 161,8 (DINCH) 16,9 (TOTM)	
	DINCH (29,7 %)		10 j 40°C	347,1 (DEHP) 55,8 (DEHT) 170,9 (DINCH) 14,1 (TOTM)	
Tubulures d'hémodialyse	DEHP	Sang bovin	4 heures	7300	Yuji Haishima et al. 2004 [82]
DM d'oxygénothérapie			6 heures	7500-12100	
Tubulures des perfuseurs et prolongateurs	DINP 34,89 %	Eau/éthanol 50/50 v/v	8h à 20 mL/h	17610 DINP 10060,9 DINCH 3687,9 DEHT 378,8 TOTM	Lise B, Teuta E. et al 2018 [88]
	DINCH 44,27 %		4h à 50 mL/h	6872 DINP 11285,9 DINCH 2672,4 DEHT 609,1 TOTM	
	DEHT 37,50 %		2 h à 100 mL/h	9961 DINP 8393,3 DINCH 1745,3 DEHT 489,1 TOTM	
Poche de nutrition parentérale (intraveineuse)	DEHP	Nutrition parentérale lipophiles	24h	200 – 700	Kambia K et al. 2003 [89]
Tubulures de nutrition parentérale (intraveineuse)			4j 4°C	800-2000	
Tubulures (nasogastriques) de nutrition entérale	DEHP	Nutrition entérale	7j 28j	200 - 542 660 - 1700	Subotic U et al. 2007 [90]
		suc gastrique artificiel	28j	635 - 1043	

Selon les données présentées dans le **Tableau 6**, les taux de plastifiants relargués sont très variables en fonction :

- du plastifiant lui-même
- de la nature du simulant (sang, plasma, émulsions intraveineuses lipidiques, eau/éthanol 50/50 v/v, etc.)
- de la durée de contact entre le DM et le simulant

Il est difficile de comparer le relargage des plastifiants entre les différentes études dans la mesure où de nombreux paramètres varient. Pour un même type de DM, les caractéristiques de celui-ci peuvent également être différentes (longueur de la tubulure, épaisseur du plastique...). Afin d'établir une comparaison acceptable, il est d'usage de calculer la quantité de plastifiant relargué par le matériau par unité de surface (masse de plastifiant retrouvé dans un volume de simulant par unité de surface de matériau en contact soit par exemple des  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ou en  $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{cm}^2$  si l'on veut comparer à volume de simulant identique).

Les paramètres pouvant influencer la migration des plastifiants sont les suivants :

- **Le type de plastifiant** pour un même DM, les plastifiants ne migrent pas de façon identique en fonction de leur nature. Par exemple, des perfuseurs plastifiés avec différents types de plastifiants (le **DEHP**, le **DINCH**, le **DEHT**, le **TOTM**) en contact avec le même simulant (éthanol/eau, 50/50, v/v) et dans les mêmes conditions expérimentales (immersion des tubulures dans le simulant à 40°C, contact de 24h) relarguent des quantités différentes de plastifiants [27]. Le **DEHP** migre davantage que les autres plastifiants en raison des propriétés physico-chimiques (évoquées dans le paragraphe 1.2.8). Le **TOTM**, quant à lui présente une migration très faible [27].
- **La nature du simulant** en contact avec le DM impacte la migration des plastifiants. Par exemple les tubulures de perfusion en PVC plastifié avec le **TOTM** en contact avec des stimulants de nature différente (glucose 5% ou préparations intraveineuses lipophiles) relarguent des quantités différentes de plastifiants malgré l'utilisation des mêmes conditions expérimentales (temps de contact 24h, température 22°C). L'analyse des données obtenues montre qu'il y a davantage de relargage dans l'émulsion intraveineuse lipidique. Ceci peut s'expliquer par la polarité différente des simulants ainsi que par une solubilité différente du **TOTM** dans les simulants utilisés [11].
- **L'influence de la durée de contact** sur la migration des plastifiants a également été étudiée dans des poches de sang plastifiées au **DEHP (Tableau 6)**. Concernant des poches ayant été conservées entre 4 et 5°C, les quantités relarguées de **DEHP** après 24 heures de contact avec le sang humain [8] sont inférieures à celles retrouvées après 21 jours de contact [9].
- **L'impact du débit sur la relargage des différents plastifiants** au cours d'une procédure de perfusion (modèle dynamique) est étudié. Les perfuseurs sont plastifiés en **DINP**, **DINCH**, **DEHT** et **TOTM** (34,89, 44,27, 37,50, 40,97 g plastifiant/100 g PVC

plastifié respectivement). Le simulant (eau/éthanol, 50/50, v/v) est perfusé à différents débits (10 à 100 mL/h) pendant 1 h, 2 h, 4 h, 8 h et 24 h. Pour un même DM, le débit ne semble pas impacter les quantités des plastifiants relargués par unité de surface et par unité de volume perfusé. Cependant, si l'on se place d'un point de vue clinique, plus le débit augmente, plus le volume perfusé augmente et donc plus la quantité de plastifiant reçue est importante pour une même durée de perfusion. Ainsi pour une même durée de perfusion, plus le débit est élevé, plus le patient est exposé aux plastifiants [88]

Selon les données des études *ex vivo*, quelles que soient les conditions, le **TOTM** reste le plastifiant étant le moins sujet au phénomène de migration et le **DEHP** celui qui présente la plus grande aptitude à diffuser à partir du PVC vers les liquides en contact. [27,80,81,88]. Dans la plupart des études, la cinétique de relargage (faites dans un modèle de perfusion ou ECMO) montre un relargage rapide et important dans les premières heures (souvent 8h) puis la quantité de plastifiant relargué diminue [27,80].

### 2.1.2 Etude *in vivo*

A notre connaissance, seule une étude menée *in vivo* permettant de mesurer la dose d'exposition aux plastifiants en situation clinique a été réalisée à ce jour. Elle concerne le relargage du **DEHP** et du **TOTM** dans des tubulures d'hémodialyse (cohorte de 20 patients présentant une insuffisance rénale chronique) [83]. L'étude montre que la présence associée de **DEHP-TOTM** dans les lignes de dialyse limite le relargage du **DEHP** ( $41,80 \pm 4,47$  mg de **DEHP** relargué à partir de tubulures plastifiées avec du **DEHP** et du **TOTM** vs  $122,95 \pm 33,94$ mg avec des tubulures plastifié au **DEHP**) [83]. A noter que, dans cet article, les DM ont été évalués dans leur intégralité et que les auteurs ne mentionnent pas la quantité initiale de chaque plastifiant présent dans les DM.

### 2.1.3 Mécanismes de migration du plastifiant à partir du DM.

Le mécanisme de migration des plastifiants de la matrice PVC des DM en contact avec différents milieux (liquides, gazeux) n'est pas étudié dans la littérature. La norme ISO 10993-18 (Évaluation biologique des dispositifs médicaux-Partie 18 : caractérisation chimique des matériaux) préconise d'utiliser des modèles mathématiques ou des essais expérimentaux afin d'estimer la quantité de substances chimiques relargables des DM. Cependant, aucun modèle mathématique pouvant estimer les quantités des plastifiants relargués des DM en contact avec différents milieux et évaluer l'exposition encourue par les patients n'a encore été élaboré.

Pour développer un modèle mathématique de migration des plastifiants des DM, les connaissances générales des transferts d'une molécule d'un milieu à l'autre sont importantes. Il est à noter qu'un modèle mathématique de migration des plastifiants a été proposé en agro-alimentaire (migration des additifs à partir des emballages plastiques alimentaires vers

les aliments) sur la base d'un transfert d'une molécule d'un milieu à un autre selon la première loi de Fick [91].

### 2.1.3.1 Diffusion et transport de matière d'un milieu à un autre

Selon les connaissances générales du monde scientifique, la migration « contenu-contenant » des plastifiants des DM se divise en quatre domaines :

- Diffusion moléculaire dans un milieu stagnant
- Diffusion moléculaire dans un fluide à régime laminaire
- Convection
- Agitation turbulente et transfert de matière entre deux phases [92].

Le transfert d'une molécule dans un fluide (exemple d'un plastifiant dans une solution médicamenteuse perfusée dans du sang) s'effectue par diffusion moléculaire et/ou convection. La diffusion entraîne la migration des particules diffusantes d'une phase (1) vers une autre phase (2) à travers une surface  $S$  selon l'équation générale de la loi de Fick. La diffusion moléculaire est un mouvement individuel au hasard des molécules [92]. Pour expliquer la loi de Fick, on analyse un système unidirectionnel de flux de particules. La concentration des particules est exprimée en nombre de particules ou de moles par unité de volume. En présence d'un gradient de concentration  $\partial c / \partial x$ , un flux de particules s'établit dans le sens descendant du gradient et ce flux est proportionnel au gradient correspondant [93] :

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \text{ [ équation 1]}$$

Le flux  $J$  est exprimé en nombre de particules ou de moles traversant l'unité d'aire par unité de temps.  $D$  est le coefficient de diffusion ( $L^2.T^{-1}$  ou  $cm^2.s^{-1}$ ).

La loi de Fick se généralise à trois dimensions [93] :

$$J = -D \nabla c \text{ [ équation 2]}$$

Dans ce cas, le coefficient  $D$  devient un tenseur de deuxième rang. L'écoulement de particules dans une direction donnée peut avoir deux origines : l'une est bien le gradient de concentration, mais l'autre est l'action d'une force extérieure, ou force de transport, sous l'effet de laquelle les particules se déplacent avec une certaine vitesse moyenne  $\langle v \rangle$  - donnant ainsi naissance à un flux  $\langle v \rangle c$ .

D'où l'expression générale [93]:

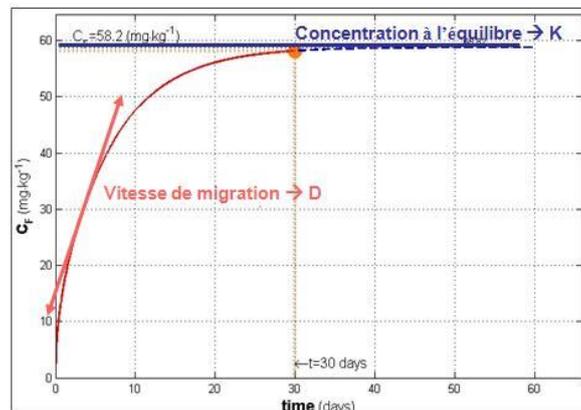
$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} + \langle v \rangle c \text{ [ équation 3]}$$

$J$  est réellement une densité de flux, mais dans la littérature  $J$  est souvent appelé flux. En général, l'utilisation de cette première loi de Fick permet de développer des modèles mathématiques pour évaluer les transferts des molécules d'un milieu à un autre.

### 2.1.3.2 Modèle mathématique utilisé en agroalimentaire

Le modèle mathématique de migration des plastifiants à partir des emballages alimentaires vers les aliments est basé sur la première loi de Fick. Les molécules de masses élevées (200 à 2000 g/mol) après un contact prolongé (plusieurs heures à plusieurs jours à température ambiante) entre l'emballage et l'aliment peuvent migrer. Pendant le contact des deux milieux, les principaux transferts sont de types sorption/désorption, diffusion et convection [91]. La migration des plastifiants contenus dans le matériau d'emballage vers les aliments se fait par la diffusion du plastifiant et est caractérisée par le coefficient de diffusion  $D$  (m<sup>2</sup>/s). Le partage des substances entre l'emballage et l'aliment est représenté par un coefficient de partage, noté  $K$  [91].

Dans la **Figure 14** (concentration d'un contaminant dans l'aliment au cours du temps) la concentration du migrant augmente avec une vitesse dans la première phase décrite par le coefficient de diffusion  $D$  et la deuxième phase présente l'équilibre du contaminant entre deux milieux déterminés par le coefficient de partage  $K$ .



**Figure 14.** Profil de concentration d'un contaminant dans l'aliment au cours du temps [91].

Vitrac et al. décrivent dans un modèle que la diffusion moléculaire (mécanisme de dispersion moléculaire du fait de la seule agitation brownienne des molécules) est le processus responsable des mouvements des plastifiants des emballages alimentaires vers les aliments. Cette diffusion dépend des facteurs de température, pression et la taille des particules. Comme la loi de Fick repose sur le postulat de densité de flux de matière,  $J(x)$  est

proportionnelle au gradient de concentration (équation [4]) où  $D_{i,p}$  est le coefficient de diffusion moléculaire:

$$\left\{ \begin{array}{l} Jx = Di,p \frac{\partial C_{(x,t)}}{\partial x} \Big|_{(x)} \\ \frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = Di,p \frac{\partial^2 C_{(x,t)}}{\partial x^2} \end{array} \right. \quad [\text{équations 4}]$$

Pour pouvoir calculer le coefficient de diffusion moléculaire  $D_{i,p}$ , le coefficient de partage  $K$  doit être calculé au préalable. L'équilibre thermodynamique est atteint lorsque le flux de molécules  $i$  migrant de l'emballage ( $P$ ) vers l'aliment ( $F$ ) est égal au flux de molécules  $i$  migrant de  $P$  vers  $F$ .

Le coefficient de partage  $K_{i,F/P}$  est défini à partir des concentrations volumiques à l'équilibre  $C_{i,F/P}^{éq}$  dans  $F$  et  $P$  (équation [5]) :

$$K_{i,F/P} = \frac{C_{i,F}^{éq}}{C_{i,P}^{éq}} \quad [\text{équation 5}]$$

Par ailleurs, le bilan de matière à l'équilibre s'écrit:

$$C_{i,p}^{t=0} = C_{i,p}^{éq} + L_{F/P} * C_{i,F}^{éq} \quad [\text{équation 6}]$$

Où  $L_{F/P} = V_F/V_P$  est le coefficient de diffusion de dilution volumique avec  $V_F$  et  $V_P$  comme les volumes respectifs de  $F$  et  $P$  mis en contact ;  $C_{i,p}^0$  est la concentration initiale de  $i$  dans  $P$ , supposée homogène.

La combinaison des équations [5] et [6] permet d'exprimer  $C_{i,F}^{éq}$  en fonction de  $C_{i,p}^0$  :

$$C_{i,F}^{éq} = \frac{C_{i,p}^{t=0}}{1/K_{i,F/P} + L_{F/P}} \quad [\text{équation 7}]$$

Connaissant la quantité de substance initialement présente dans le matériau, l'équation [7] permet de calculer la quantité maximale de la substance pouvant migrer dans l'aliment.

Pour estimer les quantités de plastifiants relargués à partir de DM en contact avec des liquides, le modèle mathématique peut se baser sur le modèle agro-alimentaire utilisant la première loi de Fick. Cependant, il sera nécessaire d'en valider la pertinence en confrontant les calculs estimatifs à l'expérience dans les conditions réelles d'utilisation des DM.

#### 2.1.4 Aspect réglementaire : limites de migration acceptables

A ce jour il n'existe pas dans la réglementation régissant les DM [6] de limites acceptables concernant la migration des additifs. La réglementation des DM (chapitre II de l'Annexe I) sur les Exigences générales en matière de sécurité et de performances, mentionne simplement que la concentration en additifs doit être inférieure à 0,1 % (fraction massique, masse/masse

de matière plastifiée) pour les composés CMR1A ou CMR1B tels que le **DEHP** (classé toxique pour la reproduction de catégorie 1B selon le règlement (CE) n°1272/2008) [5] Par ailleurs, le chapitre II de l'Annexe I du nouveau règlement également les substances possédant des propriétés perturbant le système endocrinien [6], ce qui concerne notamment le DEHP.

Les textes réglementaires ne fournissent aucune donnée sur les limites de migration acceptables (LMA) des plastifiants à partir des DM. L'Agence Européenne des produits chimiques, (en anglais, European Chemicals Agency ou ECHA) qui évalue et autorise l'utilisation de produits chimiques ne mentionne rien sur les limites de migration des plastifiants.

Les normes ISO (Organisation internationale de normalisation) n'évaluent pas les limites de migration acceptables pour les plastifiants et les concentrations des plastifiants dans le DM. Elles décrivent uniquement les méthodes à mettre en œuvre afin de déterminer ces valeurs. La norme ISO 10993 (Évaluation biologique des DM) contient deux parties sur le sujet :

- L'ISO 10993-17 décrit les méthodes à mettre en œuvre afin de déterminer les limites admissibles pour les substances relargables dans les DM.
- L'ISO 10993-18 relative à la caractérisation chimique des matériaux décrit les méthodes d'analyses ou de dosage des plastifiants (composants chimiques) dans le DM.

En absence de limites de migration acceptables (LMA) pour les plastifiants, dans le cadre du projet ARMED®, un modèle de migration du **DEHP** et des plastifiants alternatifs dans les DM de la perfusion [94] a été développé dans notre laboratoire. Le modèle propose des limites de migration acceptables des plastifiants pour les dispositifs de perfusion. Ce modèle a été inspiré des modèles mis en œuvre dans le cadre des emballages agro-alimentaires, en tenant compte de la condition d'utilisation de DM en pratique clinique. Il s'appuie sur le postulat suivant basé sur la pratique clinique : un adulte de 60 kg est susceptible de recevoir 2 litres de médicament par jour *via* une surface de 13 dm<sup>2</sup> de tubulures, soit 1 litre de solution perfusée par 6,5 dm<sup>2</sup> tubulures en PVC plastifié. Le modèle de migration proposé ensuite pour tester un DM est simple et comprend les conditions suivantes :

- Le DM est testé avec une méthode dynamique qui respecte l'hypothèse clinique établie (2 litres de solution perfusée *via* 13 dm<sup>2</sup> de DM en PVC plastifié)
- Le simulant perfusé est un mélange éthanol/eau (50/50, v/v), représentatif des émulsions lipidiques
- La température est fixée à 25 °C
- La durée de la perfusion est de 24 h

Donc la LMA est calculée avec l'équation 8 et. Elle est exprimée en mg/dm<sup>2</sup> [94]:

$$LMA (mg/dm^2) = \frac{DNEL(mg/kg/j)}{2 (L/j) * 13(dm^2)} * 60 \text{ [équation 8]}$$

Ce modèle permet de tester uniquement les DM de perfusion adulte en comparant la quantité relarguée/dm<sup>2</sup> par un DM testé selon les modalités préconisées à la LMA calculée pour chaque plastifiant. Le champ d'application de ce modèle reste très étroit.

En conclusion, il n'y a pas de normes pour tester un DM et évaluer s'il présente des risques vis-à-vis du relargage des plastifiants. La réglementation des DM (UE 2017/745) ne préconise pas les limites de migration pour les plastifiants. Ce qui est proposé en agro-alimentaire *via* le règlement Européen [85] n'a pas été transposé dans le domaine des DM. Le modèle proposé par Bernard et al. est intéressant en termes de démarche mais ne permet pas de tester tous les DM.

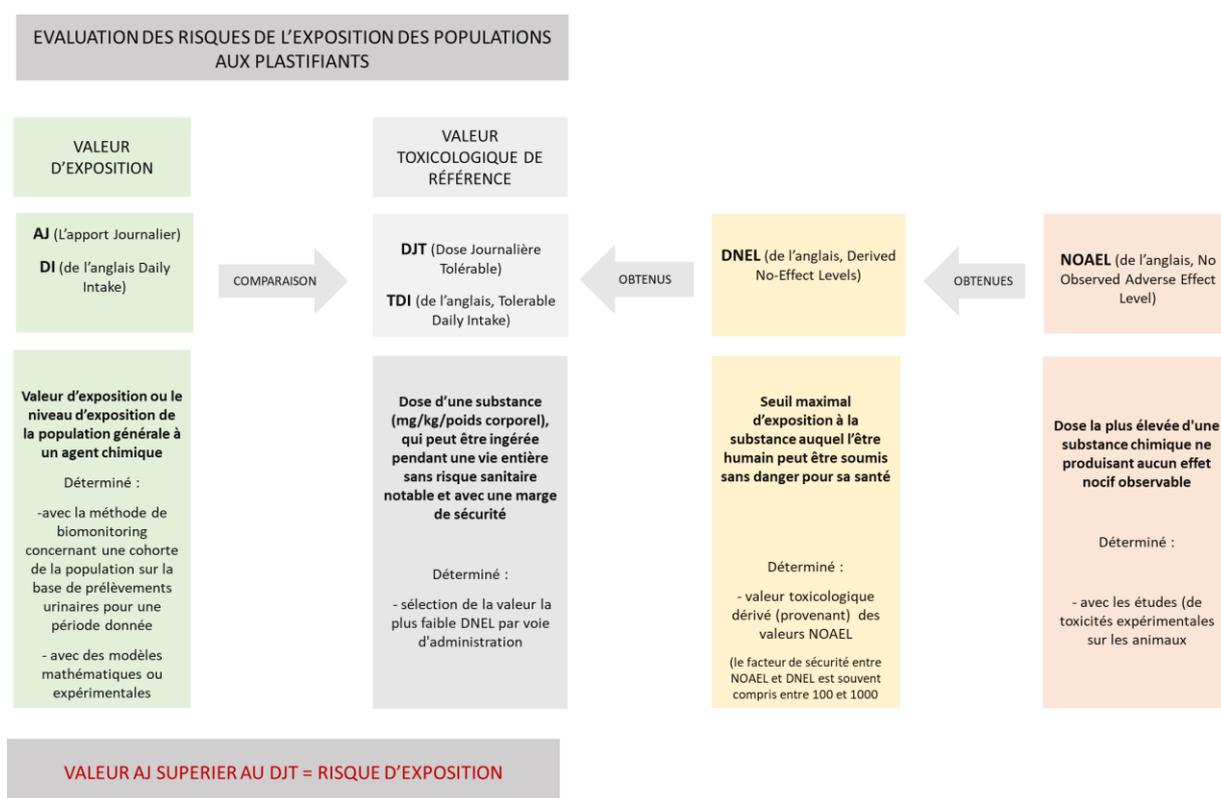
Par ailleurs en situation clinique les patients peuvent être multi-exposés *via* des DM différents et il est important de pouvoir estimer l'exposition globale. Par conséquent il est intéressant de calculer les doses relarguées par DM mais également par type de prise en charge pour évaluer les doses d'exposition du patient.

Ainsi, à ce jour il est important de pouvoir estimer la dose d'exposition en utilisant un modèle mathématique (loi de Fick) ou en mesurant exactement au plus près du patient. Ces doses calculées ou mesurées, pourront alors être comparées aux valeurs toxicologiques de référence (TDI ou DNEL).

## 2.2 EXPOSITION AUX PLASTIFIANTS

Les voies d'exposition aux plastifiants sont variables. Ces derniers peuvent en effet pénétrer dans l'organisme d'un individu par voie orale ou entérale, pulmonaire, cutanée, oculaire ou parentérale (exposition par le biais de procédures médicales) sans oublier la voie transplacentaire.

Pour évaluer le niveau d'exposition des populations vis-à-vis des plastifiants, il est nécessaire de disposer de valeurs de référence. Ainsi dans une première section, nous présenterons les valeurs de référence, l'apport journalier (AJ) permettant d'évaluer le niveau d'exposition aux composés chimiques, puis nous mentionnerons les taux d'exposition de la population aux plastifiants étudiés, plus spécifiquement l'exposition *via* les procédures médicales impliquant des DM. L'AJ permet d'avoir une vision de l'exposition de la population générale à un agent chimique. Afin de caractériser les risques éventuels liés à une exposition aux composés chimiques notamment les plastifiants, les taux d'exposition (AJ) de la population seront comparés aux valeurs toxicologiques de référence. La DNEL (dose dérivée sans effet de l'anglais, derived no-effect levels) et la dose journalière tolérable DJT (ou TDI de l'anglais, Tolerable Daily Intake) sont des valeurs toxicologiques de référence. Lorsque la DJT existe, c'est celle-ci qui est utilisée comme référence toxicologique. Si les valeurs de DJT pour un composé chimique n'existent pas, les DNEL basées sur les voies d'administration sont choisies comme références. En réalité, les DJT correspondent aux plus faibles valeurs DNEL quelle que soit la voie d'exposition. Les DNEL sont des valeurs toxicologiques estimées à partir des NOAEL (de l'anglais, No Observed Adverse Effect Level, dernières doses sans effets toxiques chez l'animal) en prenant en considération différents facteurs de sécurité. La **Figure 15** présente une synthèse des valeurs à comparer dans le cadre d'une évaluation de l'exposition d'une population à un composé chimique.



**Figure 15. Evaluation des risques de l'exposition des populations aux plastifiants.**

## 2.2.1 Valeurs de référence

### 2.2.1.1 L'apport journalier (AJ ou DI)

L'apport journalier donne la référence d'exposition de la population générale, toutes voies d'exposition confondues pour chaque composé chimique. Donc, il constitue une valeur globale résultant des expositions par voie orale, dermique ou par inhalation. Cette valeur est le plus souvent déterminée par une méthode de biomonitoring (biosurveillance) concernant une cohorte de la population sur la base de prélèvements urinaires pour une période donnée. Pour le **DEHP** et le **DINP**, les études de biomonitoring couvrent généralement toutes les voies d'expositions permettant une détermination de l'AJ sur la base des métabolites urinaires [95]. Pour les plastifiants alternatifs au **DEHP**, excepté le **DINCH** [19], toutes les voies d'exposition n'ont cependant pas encore été couvertes car ces études menées au niveau de la nourriture, la poussière ou l'air sont le plus souvent effectuées sur plusieurs années. Elles sont également difficiles à être caractérisées avec précision [45]. Le **Tableau 7** recense ainsi à titre d'exemples, l'estimation de l'exposition journalière au **DEHP** et à certains plastifiants alternatifs obtenue par des études de biomonitoring depuis les années 2000.

**Tableau 7. Estimation de l'exposition journalière au DEHP et aux plastifiants alternatifs exprimée en AJ ou DI ( $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ ).**

<b>Plastifiants</b>	<b>Apport journalier AJ ou DI (<math>\mu\text{g}/\text{kg /j}</math>)</b>	<b>Voie d'exposition</b>	<b>Références</b>
<b>DEHP</b>	2,7	Toutes les voies d'exposition (DI calculé est basé sur les concentrations de métabolites urinaires)	Wittasek et al. 2007a [95]
<b>DINP</b>	1,6	Toutes les voies d'exposition (DI calculé est basé sur les concentrations de métabolites urinaires)	Wittasek et al. 2007a [95]
<b>DINCH</b>	8,10	Toutes les voies d'exposition (DI calculé est basé sur les concentrations de métabolites urinaires)	NICNAS. 2011 [96]
<b>DEHT</b>	0,29	Inhalation (DI calculé selon le modèle EASE, modèle prédictif à usage général pour l'évaluation de l'exposition sur le lieu de travail)	Bui et al. 2016 [45]
<b>DEHA</b>	0,46	Inhalation + orale + cutanée (DI calculé selon le modèle EASE, modèle prédictif à usage général pour l'évaluation de l'exposition sur le lieu de travail)	Stuer-Laurdisen et al. 2001 [97]
<b>TOTM</b>	$1,62 \times 10^{-13}$	Inhalation + orale + cutanée (DI calculé selon le modèle EASE, modèle prédictif à usage général pour l'évaluation de l'exposition sur le lieu de travail)	Stuer-Laurdisen et al. 2001 [97]
<b>ATBC</b>	$4,36 \times 10^{-3}$	Inhalation + orale + cutanée (DI calculé selon le modèle EASE, modèle prédictif à usage général pour l'évaluation de l'exposition sur le lieu de travail)	Stuer-Laurdisen et al. 2001 [97]

Pour caractériser le risque éventuel pour la santé humaine, l'apport journalier d'exposition (AJ ou DI exprimés en  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ ) est comparé aux valeurs toxicologiques de référence à savoir les doses journalières tolérables (DJT). Par exemple l'apport journalier (AJ) en plastifiants d'une population particulière (exemple celle des patients hospitalisés en chirurgie cardiovasculaire) peut être calculé et ensuite il est comparé aux DJT de chaque composé dans l'objectif de voir si cet apport présente un risque.

### **2.2.2 Les valeurs toxicologiques de référence**

Par comparaison aux apports journaliers (AJ ou DI) présentant un taux exposition globale, les valeurs toxicologiques de référence (VTR) permettent de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Les valeurs toxicologiques de référence sont :

- La dose dérivée sans effet DNEL (de l'anglais, Derived No-Effect Levels)
- La dose journalière tolérable DJT (ou TDI de l'anglais, Tolerable Daily Intake)

Un Apport Journalier (AJ) aux plastifiants supérieurs aux valeurs DNEL ou DJT présenterait un risque potentiel pour la santé humaine.

### 2.2.2.1 La dose dérivée sans effet ou DNEL

La DNEL est une valeur toxicologique de référence représentant le seuil maximal d'exposition à la substance auquel l'être humain peut être soumis sans danger pour sa santé. La DNEL est élaborée pour les effets à seuil de dose (pour la santé humaine par exemple) ou une dose critique est déterminée à partir de la NOAEL. La NOAEL est la dose la plus élevée d'une substance chimique ne produisant aucun effet nocif observable. La NOAEL est obtenue avec des études de toxicités expérimentales sur les animaux ou épidémiologiques chez les humains. Le facteur de sécurité entre NOAEL et DNEL est souvent compris entre 100 et 1000. Il prend en compte :

- Le facteur de sécurité inter-espèces. Par exemple la sensibilité potentielle accrue de la physiologie humaine à un plastifiant par rapport à la sensibilité des espèces animales testées
- Le facteur de sécurité intra-espèce constituant la diversité physiologique au sein de la même espèce
- Un facteur de sécurité supplémentaire lié à la variabilité de la méthode utilisée [46].

Pour les plastifiants alternatifs, l'information toxicologique est partiellement disponible [45]. Actuellement on dispose des DNEL (de l'anglais, derived no-effect levels) des plastifiants absorbés par voie pulmonaire, cutanée et orale (**Tableau 9**).

**Tableau 8. DNEL des plastifiants pour une administration à long terme par voie pulmonaire, cutanée et orale dans la population générale, (ECHA, 2014b).**

	DEHP	DINP	DINCH	DEHT	DEHA	TOTM
DNEL par voie pulmonaire [mg/m <sup>3</sup> ]	0,13	15,3	21	6,86	4,4	0,98
DNEL par voie cutanée [mg/kg masse corporelle/j]	0,72	220	25	3,95	13	11,25
DNEL par voie orale [mg/kg masse corporelle/j]	0,04	4,4	2	3,95	1,3	1,13
DNEL moyenne [mg/kg masse corporelle/j]	0,30	79,90	16,00	4,92	6,23	4,45

Les NOAEL des plastifiants alternatifs (permettant d'élaborer des valeurs seuil de toxicité DNEL ou DJT) sont obtenues après différents types de toxicité (génotoxicité, toxicité par dose répétée, cancérogénicité, toxicité sur la reproduction, le développement) sur l'animal sont résumées dans le **Tableau 10**.

**Tableau 9. NOAEL (mg / kg / j) du DEHP et plastifiants alternatifs [4].**

	DEHP	DINP	DINCH	DEHT	DEHA	TOTM
<b>Toxicité par dose répétée ou toxicité chronique</b>	29 / 36 male/ femelle	15	107,1 / 389,4 et 318 / 342 male/ femelle	584 / 617 1000 / 1100 male/ femelle	40, 200 et 1000	100 / 1000 male/ femelle
<b>Génotoxicité</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Cancérogénicité</b>	98	112	40 / 200 mâle/ femelle	79 / 102 mâle/ femelle	ND	ND
<b>Toxicité sur la reproduction / le développement</b>	4,8	50	1,000	458 / 747	200	100 / 1000 male/ femelle

### 2.2.2.2 La dose journalière tolérable (DJT)

La DJT (TDI) est une valeur toxicologique de référence, étant définie par l'OMS comme la dose d'une substance (exprimée en fonction du poids corporel en mg/kg/poids corporel), qui peut être ingérée pendant une vie entière sans risque sanitaire notable et avec une marge de sécurité [98]. Les DJT (TDI) des plastifiants sont des valeurs seuils de toxicité tirées de l'ECHA représentant les DNEL par voie orale, où la valeur la plus faible a été sélectionnée (**Tableau 8**) [45].

**Tableau 10. Les valeurs des doses journalières tolérables (DJT ou TDI en anglais) par voie orale du DEHP et des plastifiants alternatifs établies après les évaluation de risques [45].**

	DEHP	DINP	DINCH	DEHT	DEHA	TOTM	ATBC
<b>DJT (TDI) µg / kg / j</b>	50	150	400	3950	300	1130	1000
<b>Références</b>	EFSA 2005a [99]	EFSA 2005b [100]	NICNAS 2011 [96]	ECHA 2014b [101] Danich EPA 2014 [102]	Stuer- Lauridsen et al. 2001 [97]	ECHA 2014b [101] Danich EPA 2014 [102]	NICNAS 2011 [96] Danich EPA 2014 [102]

Afin d'éviter un potentiel risque toxique, l'apport journalier (AJ ou DI) en plastifiant provenant des DM ne devrait pas dépasser les valeurs DJT (TDI) définis dans le **Tableau 8**.

### 2.2.3 Exposition humaine au DEHP et aux plastifiants alternatifs provenant de l'environnement

L'exposition générale des humains au **DEHP** et aux plastifiants alternatifs est importante en raison de leur utilisation dans plusieurs produits de consommation courante (emballages alimentaires, détergents, solvants, produits cosmétiques, revêtements de sol, huiles, lubrifiants, condensateurs électriques, câbles électriques, adhésifs etc...) et leurs capacités à migrer de la matrice du PVC en contact avec l'air, huiles, aliments, etc...

De ce fait, l'exposition humaine au **DEHP** (le plus étudié) peut venir des différentes sources telles que :

- l'air, la poussière, l'eau, ou la nourriture [45],
- l'air dans un milieu de travail [103],
- l'environnement maternel *in utero* (exposition mère/enfant pendant la grossesse) [104,105],
- l'allaitement [106].

**Tableau 11. Exposition humaine au DEHP et aux plastifiants alternatifs provenant de différentes sources environnementales [45].**

Plastifiant	Données d'exposition	Sources	Population	Références	Doses journalières tolérables du DEHP (DJT ou TDI (données extrait du Tableau 8) (µg / kg / j)
DEHP	5,8-19 µg/kg masse corporelle / j	Alimentaire ou environnementale	0-70 ans	SCENIHR 2015 [4]	50
	5-25,8 µg/kg masse corporelle	Alimentaire ou environnementale	0-70 ans		
DINP	0,0- 21,98 µg/kg masse corporelle / j	Ensemble des voies d'exposition	enfants de 12-23 mois	Exposition des populations [107]	150
	0,08 µg/kg/ j	Jouets	enfants	Babich et al. 2004	
DINCH	110 mg / kg	Poussière	/	Bui et al. 2016 [45]	400
	25 et 75 mg / kg	Poussière	/		
	53,3 mg / g	Matelas	/		
DEHT	440 mg / kg	Poussière	/	Bui et al. 2016 [45]	3950
DEHA	8.2-470 µg / kg	Masse alimentaire	/	Bui et al. 2016 [45]	300
	2 µg / L	Lait maternel	/		
	0,61 µg / g	Aliments	/		
	10-2800 µg / g	Aliments	adultes		
	0,55 µg / g	Aliments	enfants de 15-20 mois		
	2,78 µg / g	Aliment	/		
	5-15 ng / m <sup>3</sup>	Air intérieur	/		
2-10 µg / g	Poussière	/			
TOTM	20% p / p	Jouets en PVC et produits de	/	Bui et al. 2016 [45]	1130
ATBC	7,3 µg / g	Saké (boisson alcoolisée)	/	Tsumura et al. 2002	1000

Selon les données dans le **Tableau 11** les taux d'exposition (AJ ou DI) des populations aux plastifiants provenant des sources environnementales restent encore faibles. Ils sont bien inférieurs aux valeurs toxicologiques de référence (DJT ou TDI) des plastifiants.

#### **2.2.4 Exposition aux plastifiants *via* les procédures médicales**

Dans ce paragraphe nous nous focaliserons sur l'exposition aux plastifiants *via* les DM utilisés lors des procédures médicales telles que la nutrition artificielle, les transfusions ou encore l'hémodialyse. Ces utilisations occasionnelles peuvent en effet conduire à des expositions au **DEHP** et aux plastifiants alternatifs beaucoup plus élevées par rapport aux expositions environnementales [4].

Afin d'estimer ce risque d'exposition provenant des DM, le rapport du SCENIHR établi en 2015 [4] prend en considération les populations et actes médicaux à hauts risques.

Les populations présentant de hauts risques d'exposition sont :

- Les femmes enceintes, allaitantes
- Les nouveau-nés et prématurés

Les actes médicaux à hauts risques d'exposition sont :

- La transfusion sanguine
- La transfusion sanguine massive de globules rouges et de plasma
- La transplantation cardiaque
- Le traitement par oxygénation extracorporelle (ECMO)
- La nutrition parentérale totale
- La nutrition entérale
- L'hémodialyse
- La dialyse péritonéale
- Les procédures multiples (perfusions, nutrition...)

Le **Tableau 12** de la page suivante fait état des apports journaliers en **DEHP** reçus par les patients *via* certaines procédures médicales.

**Tableau 12. Exposition des adultes au DEHP suivant certaines procédures médicales [4].**

Procédures médicales	Apports journaliers (AJ ou DI) µg/kg masse corporelle/j	Dose journalière tolérable du DEHP (DJT ou TDI) (µg / kg / j)	Références
Hémodialyse (3 fois par semaine pendant 4 h pour un patient de 70 kg)	100 230	50	Faouzi et al. 1999 [110] Dine et al. 2000 [111]
Tubulures d'hémodialyse <b>DEHP-TOTM</b> <b>DEHP</b> 20 patients (présentant une insuffisance rénale chronique)	41800 µg de <b>DEHP</b> pour les tubulures en <b>DEHP-TOTM</b> (un patient de 70 kg sera exposé à 597 µg/kg masse corporelle/j)  122950 µg de <b>DEHP</b> pour les tubulures uniquement en <b>DEHP</b> (un patient de 70 kg sera exposé à 1756 µg/kg masse corporelle/j)	50	Kambia et al. 2001 [83]
Dialyse péritonéale	20	50	Mettang et al. 1996 [112]
Transfusion sanguine	6-90	50	Jacobson et al 1977 [113] Doull et al. 1999 [114] Health Canada 2002 [115]
Transfusion sanguine	8500	50	Jaeger et al. 1972 [8]
Transfusion sanguine	728	50	Sampson et al 2011 [116]
ECMO	3000-10000	50	Butch et al. 1996 [117]
Procédure d'aphérèse	5,7- 32,3	50	Koch et al, 2005b [118] Koch et al, 2005c [119]
Nutrition parentérale	130-280	50	Mazur et al. 1989 [120] Loff et al. 2000 [121] Kambia et al. 2003 [89]
Perfusion de médicaments non	< 5	50	Health Canada 2002 [115]
Perfusion de médicaments lipidiques	1500	50	Pearson 1993 [122]

Selon les résultats mentionnés dans le **Tableau 12**, la plupart des valeurs d'exposition du **DEHP** va au-delà des DJT (TDI). Parmi les actes médicaux à haut risque présentés dans le **Tableau 12**, l'ECMO et la transfusion sanguine lors d'exposition à court terme, ainsi que la nutrition parentérale *via* des expositions à long terme, constituent les pires scénarios d'exposition au **DEHP** à partir de DM.

Les catégories des populations présentant de hauts risques ont été définies. Les femmes enceintes, allaitantes et les nouveau-nés et prématurés sont considérées comme catégorie à

haut risque d'exposition. Plusieurs études montrent que leurs valeurs d'exposition au DEHP provenant des DM pour ces catégories sont au-dessus des DJT (TDI) [4,121,123]).

Actuellement il existe très peu d'études (*ex vivo* ou *in vivo*) permettant d'estimer la dose d'exposition journalière ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ ) en plastifiant alternatif reçu par les patients *via* une procédure médicale [80,83,88]. Le **Tableau 13** résume les études de migration des plastifiants alternatifs *ex vivo* et *in vivo* afin d'évaluer l'exposition de la population pour un type de DM.

**Tableau 13. Evaluation de l'exposition *ex vivo* et *in vivo* de la population pour un type de DM selon les études de migration des plastifiants alternatifs (les données concernant le DEHP sont mentionnées à titre comparatif).**

Procédure médicale	Plastifiant (pourcentage initial du plastifiant dans le PVC)	Simulant Temps de contact Température Débit	Données d'expositions AJ ou DI ( $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ )			Doses journalières tolérables (DJT ou TDI ( $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ ))	Références
<b>Expositions <i>ex vivo</i></b>							
Tubulures de circulation extracorporelle (CEC) <b>TOTM</b> (44,8 %) <b>DEHP</b> (0,19 %) <b>DEHT</b> (0,19 %) <b>DEHA</b> (0,27 %)	Eau/éthanol 50/50 ; v/v 24 h 37°C	160 (DEHP statique)	270 (DEHP bas débit)	70 (DEHP haut débit)	50 (DEHP)	Fernandez-Canal, Eljezi et al. 2018 [80]	
		80 (TOTM statique) DEHT (NQ*) DEHA (NQ*)	110 (TOTM bas débit) DEHT (NQ*) DEHA (NQ*)	80 (TOTM haut débit) DEHT (NQ*) DEHA (NQ*)	1130 (TOTM) 3950 (DEHT) 300 (DEHA)		
Eau/éthanol 50/50 ; v/v 6j 37°C	680 (DEHP statique)	440 (DEHP bas débit)	340 (DEHP haut débit)	50 (DEHP)	Bernard, Eljezi. et al. 2018 [88]		
	320 (TOTM statique) DEHT (NQ*) DEHA (NQ*)	390 (TOTM bas débit) DEHT (NQ*) DEHA (NQ*)	100 (TOTM haut débit) DEHT (NQ*) DEHA (NQ*)	1130 (TOTM) 3950 (DEHT) 300 (DEHA)			
Tubulures de la perfusion <b>DINP</b> (34,89 %) <b>DINCH</b> (44,27 %) <b>DEHT</b> (37,50 %) <b>TOTM</b> (40,97 %)	Eau/éthanol 50/50 ; v/v (Modèle dynamique de relargages) 24h 10 à 100 mL/h 22°C	960 (DINP) 770 (DINCH) 264 (DEHT) 97 (TOTM)				150 (DINP) 400 (DINCH) 3950 (DEHT) 1130 (TOTM)	

Procédure médicale	Simulant Temps de contact Température Débit	Données d'expositions AJ ou DI ( $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ )	Doses journalières tolérables (DJT ou TDI ( $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ ))	Références
<b>Expositions <i>in vivo</i></b>				
Tubulures d'hémodialyse <b>DEHP-TOTM</b> <b>DEHP</b> 20 patients (présentant une insuffisance rénale chronique)	Sang humain	41800 $\mu\text{g}$ (41,80) mg <b>DEHP</b> pour les tubulures en <b>DEHP-TOTM</b> (par exemple un patient de 70 kg sera exposé à 597 $\mu\text{g}/\text{kg}$ masse corporelle/j) 75100 (75,1mg) <b>TOTM</b> pour les tubulures en <b>DEHP-TOTM</b> (par exemple un patient de 70 kg sera exposé à 1072 $\mu\text{g}/\text{kg}$ masse corporelle/j) 122950 $\mu\text{g}$ (122,95 mg) <b>DEHP</b> pour les tubulures uniquement en <b>DEHP</b> (par exemple un patient de 70 kg sera exposé à 1756 $\mu\text{g}/\text{kg}$ masse corporelle/j)	50 ( <b>DEHP</b> )  1130 ( <b>TOTM</b> )  50 ( <b>DEHP</b> )	Kambia et al. 2001 [83]

NQ\* non quantifiables.

Selon l'étude *ex vivo* de Bernard et al. 2018 [88] (**Tableau 13**), la valeur d'exposition en **DINP** et **DINCH** provenant des perfuseurs est supérieure à la DJT (TDI). Pour le **TOTM** et le **DEHT** [80,83,88], les doses d'exposition sont bien inférieures à la DJT. Donc les perfuseurs en **TOTM** constituent une bonne alternative pour l'utilisation pendant les procédures médicales. Une autre étude *in vivo* (**Tableau 11**) réalisée avec les tubulures de circulation extra-corporelle (ECMO) et celles d'hémodialyses montre que le **TOTM** semble également être une bonne alternative car il expose le patient aux doses de 80, 110  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$  et 1072  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$  respectivement [83]. Ces valeurs d'expositions au **TOTM** restent inférieures aux valeurs doses journalières tolérables.

### Ce qu'il faut retenir

A l'instar du **DEHP**, les plastifiants alternatifs ne sont pas liés de façon covalente avec le DM. Pour cette raison, pendant le contact du DM avec un « fluide » (biologique, médicamenteux, gazeux), ils peuvent diffuser du PVC vers le liquide ou le gaz et exposer le patient. La migration des plastifiants à partir de la matrice en PVC dépend des propriétés physico-chimiques du plastifiant lui-même, de la nature du simulant, de la durée de contact entre le DM et le fluide. Le **TOTM** migre très peu alors que le **DEHP** présente une grande capacité à diffuser à partir du PVC vers les liquides en contact.

Actuellement il existe très peu d'études (*ex vivo* ou *in vivo*) permettant d'estimer la dose de plastifiant alternatif au DEHP à laquelle un patient est exposé chaque jour (ou apport journalier AJ en  $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ ) *via* une procédure médicale. Par ailleurs en situation clinique notamment en chirurgie cardiovasculaire les patients sont multi-exposés *via* des DM différents et il est important de pouvoir estimer l'exposition globale à tous les plastifiants. Par conséquent, il est intéressant de calculer les quantités de chaque plastifiant relarguées par DM et par type de prise en charge du patient. Ainsi, à ce jour, on peut estimer la dose d'exposition en utilisant un modèle mathématique (loi de Fick) ou en mesurant exactement au plus près du patient. Le modèle mathématique évitera de faire un grand nombre de prélèvements au lit du patient même s'il n'est pas le reflet exact de la réalité. Afin de caractériser les risques d'expositions aux plastifiants, l'apport journalier calculé, peut alors être directement comparé à la valeur toxicologique de référence, la dose journalière tolérable DJT. Les DJT des plastifiants sont des valeurs seuils de toxicité calculées à partir des NOAEL, étant la dose la plus élevée d'une substance chimique ne produisant aucun effet nocif observable chez l'animal.

Si les AJ en un plastifiant sont supérieurs aux DJT, le DM pourrait être considéré à risque pendant les procédures hospitalières.

### 3. TOXICOCINETIQUE ET TOXICITE DES PLASTIFIANTS

#### 3.1 Toxicocinétique

##### 3.1.1 Généralités

La toxicocinétique étudie le devenir des substances toxiques ou xénobiotiques (substance étrangère à l'organisme) au cours du temps pour une exposition donnée indépendamment des effets. Elle décrit l'absorption, le métabolisme, la distribution et l'élimination (ou ADME) des xénobiotiques, et donc celle des plastifiants relargués dans l'organisme par les dispositifs médicaux. Elle permet d'identifier les métabolites des plastifiants et par la suite la sélection des biomarqueurs spécifiques, leur demi-vie, le temps d'élimination ou leur extraction de l'organisme. Les biomarqueurs spécifiques représentent des réponses structurales, physiologiques mesurées dans des tissus ou des fluides corporels ou au niveau de l'organisme entier. Ils mettent en évidence l'exposition aux effets d'une ou plusieurs molécules chimiques comme les plastifiants et caractérisent la réponse d'un organisme soumis à l'exposition.

##### 3.1.2 Toxicocinétique des plastifiants

De nombreux auteurs ont décrit la toxicocinétique (ADME) du **DEHP** et des plastifiants alternatifs utilisés dans le DM tels que le **DINP**, le **DINCH**, le **DEHT**, le **DEHA** et le **TOTM** [3,15–17,21,124–126]. Ces études montrent que les plastifiants une fois dans l'organisme se transforment, avec l'aide des processus biochimiques, en métabolites primaires et secondaires (**Tableau 1** (Page 10)) qui seront principalement éliminés par voie rénale.

##### 3.1.2.1 Absorption

L'absorption est l'incorporation d'une substance dans l'organisme [127]. Elle est réalisée par le passage des membranes épithéliales lipoprotéiques par voies orale, gastro-intestinale, pulmonaire, percutanée ou intraveineuse. Les DM en PVC plastifié utilisés en chirurgie cardiovasculaire sont principalement en lien avec le système vasculaire des patients, ce qui sous-entend une exposition des patients aux plastifiants principalement par voie intraveineuse. Les malades sont également exposés aux plastifiants *via* les DM d'oxygénothérapie (voie pulmonaire).

Les valeurs d'absorption des plastifiants chez l'homme ou l'animal selon les voies d'administration sont présentées dans le **Tableau 14**.

**Tableau 14. Taux d'absorption par voies orale, pulmonaire, cutanée et intraveineuse des plastifiants chez l'homme et l'animal [4,101,128–130].**

	Voie	DEHP	DINP	DINCH	DEHT	DEHA	TOTM
<b>Absorption chez l'homme</b>	Orale	50% (SCENIHR 2015)	100% (SCENIHR 2015)	90% (SCENIHR 2015)	ND	100% (SCENIHR 2015)	ND
	Pulmonaire	75-100%, (ECHA 2013)	ND	ND	ND	ND	ND
	Intraveineuse	100% (SCENIHR 2015)	100%	100%	100%	100%	100%
	Cutanée	ND	ND	ND	ND	<0,05% (CPSC 2018 DEHA)	ND
<b>Absorption chez l'animal</b>	Orale	ND	50-70% (SCENIHR 2015)	40-49% (CPSC 2018 DINCH).	97% (SCENIHR 2015, Barber et al. 1994).	100 % (SCENIHR 2015) >90% (CPSC 2018 TOTM).	18% (CPSC 2018 TOTM). 93% (SCENIHR 2015)
	Pulmonaire	ND	75% adultes 100% nouveau nées (SCENIHR 2015)	ND	ND	ND	ND
	Intraveineuse	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Cutanée	ND	Nd	ND	ND	ND	Pas d'absorption cutanée après 12 heures d'exposition (CPSC 2018 TOTM)

ND : données non disponibles

Selon les résultats affichés dans le **Tableau 14**, l'absorption du **DEHP** par voie intraveineuse et par inhalation chez l'homme est de 100% [4]. Les données d'absorption des plastifiants alternatifs par voie pulmonaire et cutanée restent faibles.

### 3.1.2.2 Distribution

Après l'entrée dans l'organisme, en général le xénobiotique se distribue et peut atteindre les tissus [131]. Les éléments ayant une importance capitale dans la distribution intracellulaire d'un xénobiotique sont : l'eau, les lipides et les protéines (en particulier leur teneur dans les divers tissus organiques). Les xénobiotiques hydrophiles sont distribués plus rapidement dans les fluides et les tissus riches en eau, alors que la distribution des xénobiotiques lipophiles (plastifiants) peut être distribuées vers les tissus et les composantes lipidiques.

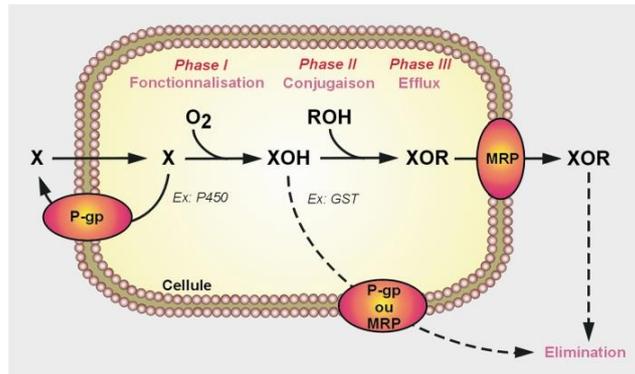
Le **DEHP** est distribué dans le foie, les reins, le plasma et les testicules des rats et ouistiti [4]. Il est largement distribué dans les tissus sans accumulation [1]. Les concentrations en <sup>14</sup>C-**DEHP** sont 20 fois plus élevées dans les tissus chez le rat que chez le ouistiti [132]. Les métabolites du **DEHP** sont sécrétés dans le lait des rats en lactation [133] ainsi que dans le lait maternel chez l'homme [134]. Chez les rongeurs, le <sup>14</sup>C-**DEHP** traverse le placenta et se distribue dans les tissus fœtaux [135] tandis que le **MEHP**, son métabolite primaire, est présent dans le liquide amniotique du rat et de l'homme [136,137].

Concernant la distribution des plastifiants alternatifs, 72% de la dose de **TOTM** administrée par voie intraveineuse a été retrouvée dans le foie 24 heures après l'administration. Le **DINCH** est également distribué vers les tissus et organes [130]. Actuellement on ne dispose pas de données de distribution du **DINP**, **DINCH**, **DEHT**, **DEHA** dans un organe ou un tissu précis, mais leur voie métabolique étant similaire à celle du **DEHP**, le foie et les reins sont potentiellement des organes cibles.

### 3.1.2.3 Métabolisme et élimination

Le métabolisme est l'ensemble de réactions chimiques et de voies par lesquelles les organismes vivants transforment les substances. Les xénobiotiques, les plastifiants dans notre cas, une fois dans l'organisme ou à l'intérieur de la cellule (**Figure 16**) se transforment, avec l'aide des processus biochimiques, en produits de biotransformation ou métabolites, plus polaires (plus hydrophiles) que le composé parent et donc plus hydrosolubles, entraînant une élimination plus facile par voie rénale [3,15,16,18,19,21,124,125]. Les biotransformations sont en général des processus de détoxification (les métabolites formés sont moins actifs que le composé parent ou inactifs), mais dans certains cas il peut y avoir une toxicité supérieure, tel est le cas du **MEHP**, plus toxique que sa molécule mère, le **DEHP** [1,2]. Les principaux sites des biotransformations des molécules sont le tube digestif, le sang, le foie, les reins et les poumons. Un seul composé peut donner plusieurs métabolites, les plastifiants ne dérogeant pas à cette règle [3,16,18,19,21,72,124,125].

La biotransformation des xénobiotiques s'effectue en général par des réactions de fonctionnalisation (Phase I), conjugaison (Phase II) ou élimination (Phase III) (**Figures 16 et 17**)



MRP (de l'anglais, Multidrug Resistance-associated Proteins ; P-gp : P-glycoprotéine)

**Figure 16. Métabolisme des xénobiotiques [107].**

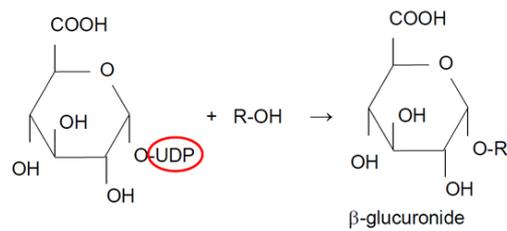
Les réactions de phase I constituant la première étape du métabolisme d'un xénobiotique sont :

- Les réactions d'hydrolyse par des enzymes de type estérases contenues dans les tissus et le plasma.
- Les réactions d'oxydation ou perte d'électrons. Elles peuvent être microsomales et se produisent sous l'action de mono-oxygénases situées dans le réticulum endoplasmique de la cellule telles que les oxydations aliphatiques  $R-CH_3 \rightarrow R-CH_2OH$ . Elles peuvent également être non microsomales, se produisant sous l'action d'oxydo-réductases situées dans les mitochondries comme la déshydrogénation des alcools et des aldéhydes  $R-CH_2-OH \rightarrow R-CH=O \rightarrow R-COOH$ . Les mono-oxygénases sont majoritairement localisées au niveau hépatique et intestinal. Un très grand nombre de réactions d'oxydation sont catalysées par les cytochromes P450 (plus de 90%).
- Les hydrogénations effectuées par les bactéries de la flore intestinale où les enzymes intervenants sont des réductases microsomales du cytochrome P450

Les réactions de phase II repose sur la conjugaison d'un métabolite issu de phase I avec une molécule endogène. Cette réaction rend ainsi les métabolites plus hydrosolubles pour être excrétés par la voie rénale [138].

La réaction la plus fréquente de la phase II est la glucurono-conjugaison. Cette conjugaison s'effectue entre les groupements hydroxylés (exemple -OH, -COOH) du métabolite et l'acide  $\beta$ -glucuronique (dérivé du glucose). Elle a lieu dans le système enzymatique microsomal hépatique, catalysée par les UDP-glucuronosyltransférases (uridine diphosphate glucuronosyl-transférase ou UGT), mais également au niveau rénal, intestinal ou cutané.

La réaction catalysée par l'UGT est une substitution nucléophile (**Figure 17**) [131] d'ordre 2 avec inversion de configuration (inversion de Walden) [139]



**Figure 17. La réaction de glucurono-conjugaison.**

D'autres réactions de phase II moins fréquentes sont la sulfoconjugaison, la méthylation, l'acétylation, la conjugaison avec des amino-acides ou le glutathion ou encore des trans-sulfurations [131].

Dans la phase III, les métabolites conjugués glucuroniques sont excrétés par voie urinaire ou par la bile [4].

Compte tenu des éléments précédents, le métabolisme humain du **DEHP** est schématisé dans la **Figure 18**.

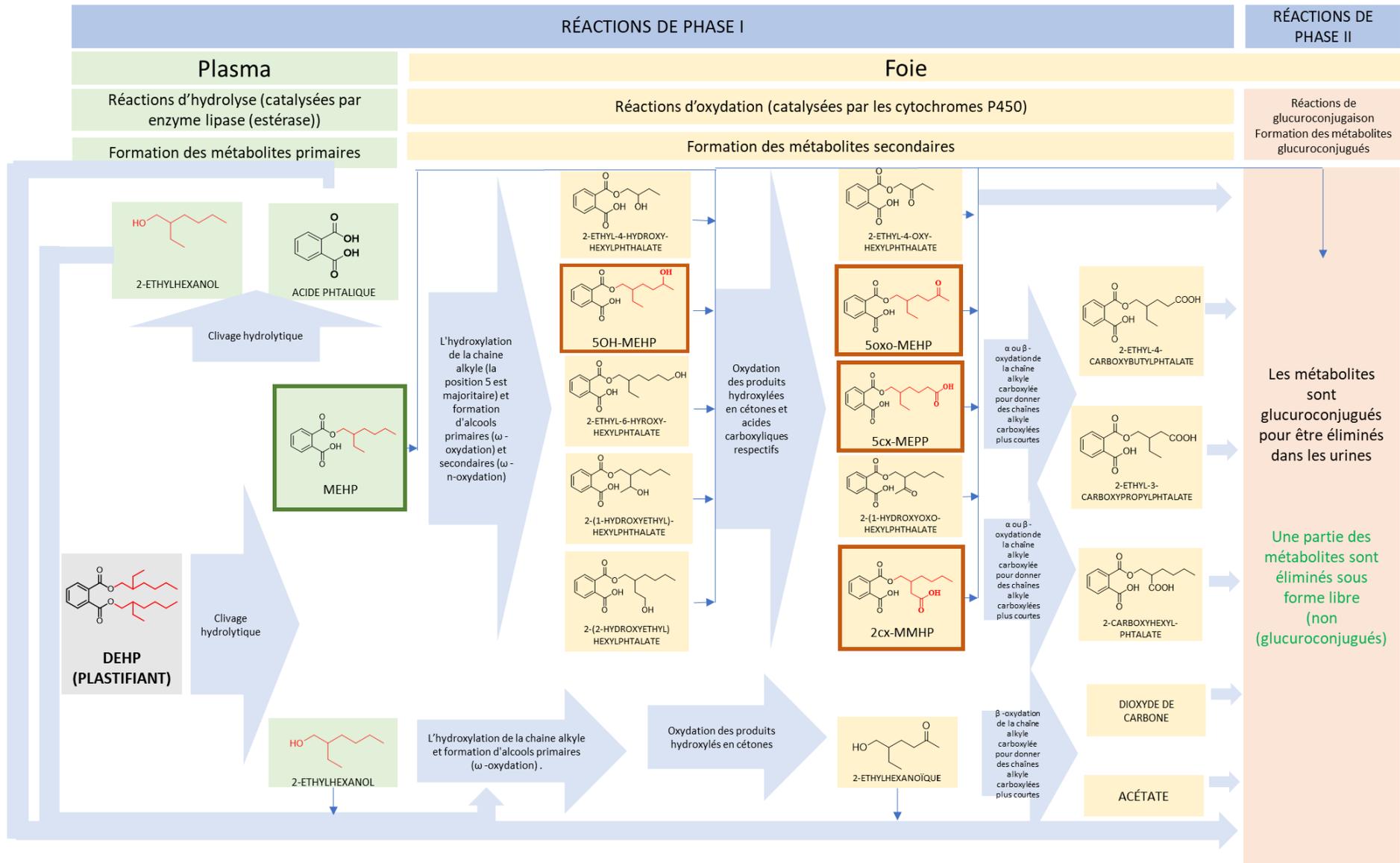


Figure 18. Métabolisme du DEHP chez l'homme après administration par voie orale (étudié par Koch et al 2006 et décrit dans le rapport SCENIHR 2015 [4,124]).

L'étude du métabolisme humain du DEHP (Figure 18) réalisée par Koch et al. a permis l'identification et la quantification des métabolites primaires et secondaires du **DEHP**, parmi lesquels des biomarqueurs spécifiques (encadrés en couleur verte et marron foncé dans la **Figure 18**).

Les plastifiants alternatifs au **DEHP** tels que le **DINP**, le **DINCH**, le **DEHT**, le **DEHA** et le **TOTM** administrés par voie orale (excepté le **TOTM**) suivent, chez l'homme, la même voie métabolique que le **DEHP** [16,17,19,21,125].

Il est important de noter que :

- La voie métabolique des plastifiants est la même pour les humains et les animaux (rats) mais le profil métabolique du plastifiant chez l'homme est différent de celui déterminé chez le rat (exemple, 87,4% des métabolites de **DEHP** sont éliminés sous forme libre et seulement 11,2% sous forme de glucuro-conjuguée chez le rat mâle après 24 heures l'administration [4].
- La voie métabolique des plastifiants est la même quelle que soit la voie d'exposition (orale ou intraveineuse). Donc le **DEHP**, le **DINP**, le **DINCH**, le **DEHT**, le **DEHA** et le **TOTM** utilisés dans le DM, une fois relargués du DM et entrés en contact avec le patient, vont suivre la même voie métabolique quelle que soit la voie d'exposition [4].
- Le métabolisme est différent en fonction de l'âge (les nouveau-nés et les nourrissons (jusqu'à l'âge d'un an) peuvent présenter des taux plus faibles de métabolites conjugués en raison de la baisse des taux d'enzymes UDPGT [4].

Les études du métabolisme humain du **DINP** [17], du **DINCH** [19], du **DEHT** [125], du **DEHA** [16] et du **TOTM** [21] après administration orale (excepté le **TOTM**), ont ainsi permis l'identification et la quantification de leurs métabolites primaires et secondaires respectifs. Dans Le **Tableau 16**, nous avons ainsi résumé quelques données importantes concernant les métabolites primaires et secondaires des plastifiants alternatifs dont leurs acronymes, leur demi-vie, leurs pourcentages excrétés et la méthode de quantification associée. Il est à noter que les structures chimiques de tous ces métabolites figurent dans le **Tableau 1** (Page 10).

**Tableau 15 : Métabolites primaires et secondaires des plastifiants, biomarqueurs spécifiques, demi-vies et pourcentages excrétés dans l'urine.**

	Matrice Population Taille Echantillon Quantité administrée Voie d'administration	Méthode de dosage Limite de quantification	Concentration urinaire en métabolite	Demi-vie des métabolites ou des biomarqueurs spécifiques	Pourcentage des biomarqueurs excrétés dans les urines	Référence
<b>DEHP</b>	Urine Homme N=3 48,1 mg ou 650 µg / kg pc / j orale	LC-MS/MS LOQ 0,5 et 1,0 µg/L	Métabolite primaire : 3,6 mg/L (MEHP à 2h)  Métabolite secondaire : 8,2 mg/L (5cx-MEPP à 4h) 0,9 et 1,2 mg/L (2cx-MMHP à 8 et 10h) 10,0 mg/L (5OH-MEHP à 4h) 6,2 mg/L (5oxo-MEHP à 4h)	Première phase d'élimination 14h :  5h (MEHP) 12-15h (5cx-MEPP) 10h (5OH-MEHP) 10h (5oxo-MEHP)  Deuxième phase d'élimination 15-24h : 24h (2cx-MMHP)	67,0% de la dose de <b>DEHP</b> est extrait comprenant :  Métabolite primaire 5,9% (MEHP)*  Métabolite secondaire 23,3% (5OH-MEHP) * 18,5% (5cx-MEPP) * 15,0% (5oxo-MEHP) * 4,2% (2cx-MMHP) *	Koch et al. 2005 [140]
<b>DINP</b>	Urine Homme N=1 1,27 mg / kg pc / j orale	LC/LC-MS/MS LOQ 1,0 µg/L	Métabolite primaire 2,61 mg/L (MINP à 2h)  Métabolite secondaire 22,4 mg/L (OH-MINP à 4h) 11,11 mg/L (oxo-MINP à 4h) 10,9 mg/mL (cx-MINP à 8h)  Métabolite primaire 0,0059 mg/L (MINP à 48 h) Métabolite secondaire 0,165 mg/L (MINP à 48 h) 0,0498 mg/L (OH-MINP à 48 h) 0,0251 mg/L (cx-MINP à 48	Première phase d'élimination 8-24h :  3h (MINP) 5h (OH-MINP) 5h (oxo-MINP) 5h (cx-MINP)  Deuxième phase d'élimination 24-48h : 3h (MINP) 12h (OH-MINP et oxo- MINP) 18h (cx-MINP)	40% de la dose de <b>DINP</b> est extrait comprenant :  Métabolite primaire : 2% (MMeOP)  Métabolites secondaires 20% (7OH-MMeOP) * 11% (7oxo-MMeOP) * 11% (7carboxy-MMeHP)*	Koch et Angerer. 2007 [17]
<b>DINCH</b>	Urine Homme N=3 50 mg ou 0,552 and 0,606 mg / kg pc / j orale	LC/MS/MS LOQ 0,1 µg/L	Métabolite primaire : 3,107 µg/L (CHDA à 5h) 178 µg/L (MINCH à 5h)  Métabolite secondaire : 2,752 mg/L (OH-MINCH à 5h) 487,9 mg/L (cx-MINCH à 5h) 667,8 mg/L (oxo-MINCH à 5h)  Métabolite secondaire : 1 mg/L (OH-MINCH à 24h)	Première phase d'élimination 4-12h : 2,5-3,5h (CHDA) 2,5h (MINCH) 6h (cx-MINCH) 2,5-3,5h (OH-MINCH) 2,5-3,5h (oxo-MINCH)  Deuxième phase d'élimination 24h : 10,25h CHDA 16,25h (MINCH) 16,5h (cx-MINCH) 18h (cx-MINCH) 9,5h (OH-MINCH) 9h (oxo-MINCH)	39,2% de la dose de <b>DINCH</b> est extrait comprenant :  Métabolites primaires 1% (MINCH)* 23,7% (CHDA)*  Métabolites secondaires 10,7% (OH-MINCH) * 2,0% (oxo-MINCH) * 2,0% (cx-MINCH) *	Holger M. Koch, Andre Schutze 2013 [19]

	Matrice Population Taille Echantillon Quantité administrée Voie d'administration	Méthode de dosage Limite de quantification	Concentration urinaire en métabolite	Demi-vie des métabolites ou des biomarqueurs spécifiques	Pourcentage des biomarqueurs excrétés dans les urines	Référence
<b>DEHT</b>	Urine Homme N=3 50 mg ou 0,59 mg/kg pc orale	LC/MS/MS LOQ 0,2 µg/L 5cxMEPTP et 5oxo-MEHTP  0,3 µg/L pour 5OH-MEHTP  0,4 µg/L 2cx- MMHTP.	Métabolite primaire : <b>MEHTP</b> Métabolite secondaire : <b>86,7 µg/L</b> (5OH-MEHTP à 3h) <b>50,2 µg/L</b> (5oxo-MEHTP à 3h) <b>923 µg/L</b> (5cx-MEPTP à 3h) <b>21,5 µg/L</b> (2cx-MMHTP à 3h)	Première phase d'élimination 4-12h : <b>7 h</b> (5OH-MEHTP) <b>7 h</b> 5oxoMEHTP <b>7 h</b> 5cx-MEPTP <b>7 h</b> 2cx-MMHTP  Deuxième phase d'élimination 24h-48h : ND	15,20% de la dose de <b>DEHT</b> est extrait comprenant :  Métabolite primaire : <b>0,02 %</b> MEHTP  Métabolites secondaires : <b>13,00 %</b> 5cx-MEPTP** <b>1,82 %</b> 5OH-MEHTP** <b>1,00 %</b> 5oxo-MEHTP** <b>0,29 %</b> 2cx-MMHTP**  <b>28,9 %</b> 5OH-MEHTP* à 48h <b>27,3 %</b> 5oxo-MEHTP* à 48h <b>91,25 %</b> cx-MEPTP * à 48h <b>91,32 %</b> cx-MMHTP* à 48h	Frederik Lessmann. 2017 [125]
<b>DEHA</b>	<i>In vitro</i> Microsomes hépatiques humains 5 h d'incubation avec <b>DEHA</b>	LC/MS/MS LOQ 0,2-0,4 µg/L	ND	<b>0,77 h</b> (MEHA)	ND	Manori J. Silva. 2013 [16]
<b>TOTM</b>	<i>In vitro</i> Hydrolyse enzymatique des échantillons urinaires  2 h, 37 °C	LC-MS/MS LOQ µg/L  1,5 µg/L (1- MEHTM) 1,0 µg/L (2- MEHTM) 0,7 µg/L (4- MEHTM) 0,9 µg/L (5OH-1- MEHTM) 0,3 µg/L (5oxo-1- MEHTM) 0,5 µg/L (5cx-1- MEPTM) 0,5 µg/L (5OH-2- MEHTM) 0,9 µg/L (5oxo-2- MEHTM) 0,8 µg/L (5cx-2- MEPTM) 0,8 µg/L (2cx-1- MMHTM) 0,5 µg/L (2cx-2- MMHTM)	ND			Christine Höllerer 2018 [21]

\* Métabolites non conjugué ; \*\*Métabolites glucuroconjugué ; ND : Non déterminé

En conclusion, la connaissance des métabolites primaires et secondaires des plastifiants et plus particulièrement des biomarqueurs permet :

- De synthétiser ces métabolites en quantité suffisante pour mener des études de toxicologie supplémentaires chez l'homme et/ou l'animal ou mener des études concernant leur toxicité propre notamment les effets perturbateurs endocriniens.
- De réaliser des études de biomonitoring permettant d'évaluer l'exposition (AJ) aux plastifiants alternatifs sur la base de prélèvements urinaires pour une période donnée. Les méthodes analytiques développées permettent par la suite la quantification des plastifiants et leurs métabolites afin de vérifier si ces valeurs ne dépassent pas les valeurs toxicologiques de référence le DJT.

## 3.2 TOXICITE

### 3.2.1 Généralités

Les études de toxicité d'un DM sont réalisées selon la norme ISO 10993 contenant plusieurs sous-parties présentées sous le titre général « Évaluation biologique des DM ». Celles en relation directe avec la toxicité sont :

- Partie 3 : Essais concernant la génotoxicité, la cancérogénicité et la toxicité sur la reproduction
- Partie 5 : Essais concernant la cytotoxicité *in vitro*
- Partie 10 : Essais d'irritation et d'hypersensibilité retardée
- Partie 11 : Essais de toxicité systémique.

Les normes ISO ne permettent donc pas d'évaluer les risques liés à la toxicité des additifs à partir des DM mais elles peuvent offrir un moyen (décrivent les méthodologies et les techniques à utiliser) de se conformer aux exigences essentielles de la directive au règlement des DM.

Il est important de noter que la toxicité des additifs ajoutés au DM, donc celle des plastifiants, est évaluée bien avant l'autorisation d'utilisation de ces derniers dans le DM. C'est l'ECHA qui évalue et autorise l'utilisation de produits chimiques *via* le règlement REACH. Il s'agit d'un règlement de l'Union Européenne adopté pour mieux protéger la santé humaine et environnementale contre les risques liés aux substances chimiques [141]. Ce règlement impose à tous les fabricants et importateurs de substances (y compris les substances importées sous forme de mélange) d'enregistrer toutes les substances auprès de cet organisme. (ECHA) [142].

Afin de se conformer aux règlements actuels (REACH), les lignes directrices de l'OCDE (401-492) concernant les essais de produits chimiques mentionnent un ensemble de méthodes permettant de tester les effets des produits chimiques sur les systèmes biologiques, sur la santé. Ces méthodes sont agréées internationalement et utilisées par les gouvernements, l'industrie et les laboratoires indépendants pour déterminer l'innocuité des produits chimiques et préparations [143].

Selon les normes actuelles (REACH), les principales caractéristiques toxiques qui doivent être évaluées pour chaque substance chimique sont :

- La toxicité aiguë (une seule dose) ou chronique (exposition répétée ou prolongée) d'une substance administrée à des animaux par voie orale, par inhalation, par application cutanée (rats ou souris dont la durée des tests est généralement menée sur 28 ou 90 jours)
- L'irritation et la corrosion (lésions irréversibles) de la peau (lapin albinos)
- L'irritation oculaire (œil de bœuf ou de poulet en remplacement du test sur les lapins vivants)
- La sensibilisation cutanée (allergie par contact avec la substance testée). La méthode de référence actuelle utilise des souris vivantes en remplacement d'un test sur cobayes
- La toxicité génétique (les rats ou des souris transgéniques sont utilisés pour cette évaluation)
- La toxicité pour la reproduction et le développement prénatal (souris, rats ou lapins étudiés sur une génération)
- La carcinogénicité [127,144].

En addition et en fonction du danger que la molécule présente pour la santé humaine, d'autres études de toxicité comme la neurotoxicité ou la perturbation du système endocrinien peuvent être réalisées lors de l'évaluation d'une substance chimique. En effet, avant d'autoriser la mise en marche d'un produit chimique, REACH ne demande pas systématiquement des études sur les effets perturbateurs endocriniens ou des études de neurotoxicité.

Malgré toutes les études de toxicité réalisées sur les animaux, il reste cependant difficile de prédire la toxicité pour l'homme en raison de la diversité physiologique [4]. La toxicologie moderne s'oriente donc vers la caractérisation de voies toxicologiques impliquées dans des effets indésirables. La toxicologie peut notamment bénéficier des innovations récentes et maintenant maîtrisées, obtenues lors des cultures de cellules humaines [144]. Afin de prouver l'innocuité d'une substance chimique les études de toxicité humaine devraient être donc être réalisées et approfondies. Les obligations de vérifier la toxicité sur tous les nouveaux produits chimiques (règlement Reach) pourraient diminuer le risque pour l'homme, mais certains anciens produits existant sur le marché vont être encore un problème de santé publique car plusieurs années d'études vont être nécessaires afin de de réaliser des études toxicologiques complètes.

La toxicité du **DEHP** et le risque pour la santé humaine sont maintenant bien connus. Concernant la toxicité des plastifiants alternatifs utilisés actuellement dans les DM, elle s'avère non dangereuse pour la santé humaine selon le règlement REACH. Afin d'avoir plus de visibilité sur la toxicité des plastifiants alternatifs, les définitions, le mécanisme de toxicité ainsi que des données sur la toxicité animale et humaine sont décrites dans la suite de ce manuscrit.

### 3.2.2 Définitions

La toxicité est la capacité intrinsèque d'un agent chimique à avoir un effet nocif sur un organisme. Cet effet est lié à la dose, à la voie d'absorption, au type de toxicité, à la gravité des lésions ainsi qu'au temps nécessaire à l'apparition d'une lésion [145]. Pour mieux comprendre la toxicité d'une molécule quelques définitions et concepts sont relevés de l'Encyclopédie de sécurité et de santé au travail [127].

- « Un danger représente une toxicité potentielle pouvant survenir dans un cadre ou une situation déterminée.
- Un risque est la probabilité d'apparition d'un effet nocif spécifique.
- La relation dose-effet est la relation entre la dose et l'effet à l'échelle de l'individu tandis que la relation dose-réponse désigne la relation entre la dose et le pourcentage d'individus présentant un effet spécifique.
- La dose est souvent exprimée en tant que quantité (mg/kg/masse corporelle) de xénobiotique ou toxique ayant pénétré l'organisme.
- Une dose seuil est le niveau de dose en dessous duquel aucun effet observable ne survient.
- La DL<sub>50</sub> (dose létale 50) est la dose qui entraîne le décès de la moitié du lot d'animaux de laboratoire soumis au toxique étudié. Elle est souvent employée dans la littérature classique comme une mesure de la toxicité aiguë des produits chimiques.
- La NOEL (NOAEL) No Observed Adverse Effect Level (définition à la page 56)
- La DJT dose journalière tolérable ou TDI (de l'anglais, Tolerable Daily Intake (définition à la page 55).
- Le DNEL de l'anglais, derived no-effect levels (définition à la page 56).
- La valeur LOEL (Low Observed Effect Level) correspond à la dose efficace la plus faible sur une courbe dose-réponse, ou à la plus faible dose provoquant un effet. Un facteur de sécurité est un chiffre formel et arbitraire par lequel on divise les valeurs NOEL ou LOEL obtenues expérimentalement pour définir une dose admissible chez l'humain. Ce facteur, souvent employé en toxicologie alimentaire mais aussi en toxicologie professionnelle, peut servir à extrapoler des données issues de petites populations à des populations plus importantes. Les facteurs de sécurité varient de 10<sup>0</sup> à 10<sup>3</sup>. On considère qu'un facteur de sécurité de deux suffit à protéger d'un effet peu sévère (par exemple, une irritation), alors que pour tous les effets très sévères (par exemple, un cancer), on applique un facteur pouvant aller jusqu'à 1 000.
- Les extrapolations sont des estimations théoriques qualitatives ou quantitatives de toxicité (extrapolation d'un risque) obtenues par déduction de données d'une espèce à l'autre, ou d'un ensemble de données dose-réponse obtenues dans une zone de doses élevées à des zones de dose-réponse pour lesquelles il n'existe pas de données.
- Les effets systémiques sont les effets toxiques observés dans des tissus éloignés de la voie d'absorption.

- *L'organe cible est l'organe principal ou l'organe le plus sensible atteint lors d'une exposition.*
- *Les effets aigus sont des effets survenant rapidement (en général en moins de vingt-quatre heures) après une exposition limitée; ils peuvent être réversibles ou irréversibles.*
- *Les effets chroniques surviennent après une exposition prolongée (mois, années, décennies) ou persistent une fois que l'exposition a cessé.*
- *Une exposition aiguë est une exposition de courte durée, tandis qu'une exposition chronique est une exposition de longue durée (parfois toute la vie).*
- *La tolérance est le phénomène qui se produit lorsque des expositions répétées entraînent une réponse inférieure à celle que l'on observe sans prétraitement » [127].*

Toutes ces définitions sont valables pour toutes les types de toxicité des plastifiants qui sont liées à la dose. Mais les effets perturbateurs endocriniens échappent à ces règles. Les effets perturbateurs endocriniens des plastifiants peuvent suivre des courbes non monotones et présenter des effets toxiques à très faible dose [146].

### 3.2.3 Mécanisme de toxicité

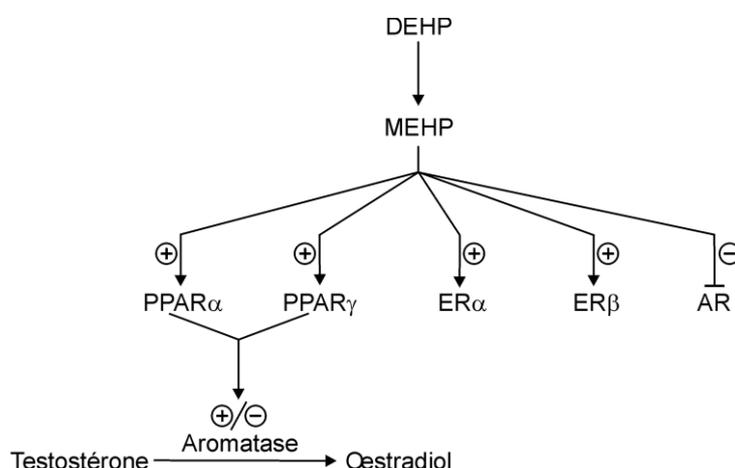
En général la connaissance du mécanisme toxique d'une substance permet de prévenir les risques et permet de concevoir des produits chimiques mieux tolérés. Les mécanismes de toxicité peuvent être simples ou complexes. Les mécanismes de toxicité sont :

- Les mécanismes de toxicité aigüe : ils sont fonction de la dose ou de la sévérité de l'exposition. Par exemple les effets aigus après une dose élevée pouvant entraîner la mort ou une incapacité grave : c'est le cas des asphyxiants simples (gaz inertes), asphyxiants chimiques (CO), des dépresseurs du système nerveux central (SNC) (par exemple certains solvants). On peut observer également des effets cutanés (acides et bases), une sensibilisation chimique (2,4-dinitrochlorobenzène se lie à certaines protéines cutanées) ou des effets oculaires (les acides forts, bases fortes, agents tensioactifs comme les détergents).
- Les mécanismes de toxicité subchronique et chronique: le mécanisme des pesticides organophosphorés inhibant l'acétylcholinestérase (AChE) dans le cerveau et le système nerveux périphérique, l'activation métabolique de tétrachlorure de carbone, le chloroforme, l'acétylaminofluorène, les nitrosamines sont activés par voie métabolique en radicaux libres et constituent des espèces chimiques induisant un des mécanismes du cancer (lésions de l'ADN (mutations somatiques) [127].

D'autres paramètres importants dans la toxicité sont la lésion et la mort cellulaire. La lésion cellulaire est un phénomène qui perturbe l'homéostasie de la cellule et permet ainsi la survenue d'un certain nombre d'événements. Les lésions létales entraînent la mort cellulaire. Pendant la phase pré létale, des modifications importantes se produisent et varient en fonction du type de cellule et de lésion telle que:

- l'apoptose (une augmentation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  stimule la sortie des cations  $\text{K}^+$  induisant une condensation cellulaire, mécanisme nécessitant probablement de l'ATP)
- l'oncose (augmentation de la concentration en ions  $\text{Na}^+$  dans le cytosol cellulaire,).
- La nécrose quant à elle, se produit après la mort cellulaire (lorsque la cellule est transformée en débris éliminés par la réponse inflammatoire). Elle peut être apoptotique (au niveau cellulaire) ou oncotique (au niveau d'un tissu, d'un organe)[127].

Le mécanisme de toxicité du **DEHP** et celui des autres phtalates ou plastifiants alternatifs utilisés dans les DM est peu connu en général. De nombreux résultats indiquent que les récepteurs nucléaires PPAR (peroxysome proliferator activated receptor) sont des cibles privilégiées des phtalates chez les mammifères (**Figure 19**).



**Figure 19. Cible des phtalates [107]**

Les récepteurs nucléaires sont une famille de récepteurs biochimiques ou des protéines actives dans le noyau des cellules qui, pour nombre d'entre elles, transmettent à celles-ci des signaux hormonaux spécifiques conduisant à la modulation de l'expression de gènes cibles. Cette famille est constituée de 49 membres identifiés à ce jour chez l'homme (plus d'une centaine toutes espèces confondues). Les cibles principales des phtalates parmi les récepteurs nucléaires sont les récepteurs PPAR  $\alpha$  et  $\gamma$ . Les récepteurs des œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$ , le récepteur des androgènes, les récepteurs des xénobiotiques CAR (en anglais, constitutive activated receptor) et PXR (en anglais, pregnan X receptor) ont été également identifiés comme des médiateurs possibles des effets de ces molécules [107] (**Figure 19**).

Les phtalates sont connus comme perturbateurs sur le système endocrinien [147]. Ils ont un impact sur les œstrogènes et les androgènes mais également sur les hormones thyroïdiennes qui jouent un rôle central dans le développement du cerveau. Morgenstern et al ont montré que la thyroxine libre diminuait chez les filles de 3 ans (mais pas chez les garçons) alors que les taux de phtalates augmentait [148].

### 3.2.4 Toxicité animale

Compte tenu des nombreuses études de toxicité mené sur le **DEHP** et son classement CMR 1B (cancérogène, mutagène ou toxique pour la reproduction), cette partie bibliographique se limitera à la toxicité des plastifiants alternatifs au **DEHP**. Cependant, le mécanisme de toxicité du **DEHP** permet d'identifier un certain nombre de mécanismes que l'on retrouve à un moindre degré avec d'autres composés du groupe des phtalates.

Concernant la toxicité pour la reproduction et le développement, le **DINP** n'entraîne pas de malformations de l'appareil reproducteur (rats mâles) en période de gestation et d'allaitement [149] et il n'est pas tératogène ou toxique pour le développement sélectif [150]. Une autre étude montre que le **DINP** réduit de 2,3 fois la production de la testostérone fœtale (T) des rats par rapport au **DEHP** [151]. Le **DINP** montre une double induction de plusieurs métabolites de la testostérone chez le poisson mâle (médaka (*Oryzias latipes*), espèce originaire d'Asie du sud-est) [152]. L'exposition au **DINP** affecte négativement la croissance et la maturation des ovocytes, conduisant à un développement gonadique anormal et à la reproduction chez le poisson-zèbre [153].

Selon des études chroniques cancérigènes, le **DINP** induit un excès significatif de néoplasie hépatique chez le rat et la souris. Ceci est expliqué par le mode d'action de la prolifération des peroxyosomes. Le **DINP** induit des tumeurs rénales chez des rats mâles médiés par l'alpha 2μ-globuline selon un mécanisme qui n'est pas considéré comme pertinent pour l'homme [4]. Actuellement il n'y a pas des données de toxicité animale sur les métabolites du **DINP**.

L'étude de la toxicité de **DINCH** chez le rat [154] ne montre aucun effet sur le comportement, le poids des organes, les hormones thyroïdiennes, les organes (foie, rate, reins), la toxicité testiculaire et la prolifération des peroxyosomes dans le foie après une perfusion continue jusqu'à 29 jours. En dehors d'un effet spécifique de l'espèce sur les reins (non pertinent pour l'homme), des études de toxicité répétées (chez les rats) incluant une étude de 2 générations montrent l'hyperplasie / hypertrophie thyroïdienne avec une NOAEL de 40 mg / kg / j [4].

Mais, une étude récente menée chez le rat (génération suivante ou descendants) met en évidence des risques concernant le **DINCH** [155]. L'exposition au **DINCH** semble affecter directement la fonction cellulaire de Leydig, pouvant induire un vieillissement prématuré des testicules et une altération de la capacité métabolique hépatique.

En ce qui concerne la toxicité des métabolites du **DINCH**, le **MINCH**, métabolite primaire du **DINCH**, est un agoniste de PPAR-α puissant et un perturbateur métabolique, capable d'induire la différenciation pré-adipocytaire [156].

Le **DEHT** a un effet mineur sur le poids du foie en 90 jours chez les rats alimentés avec 1,0% de **DEHT** [157]. Il n'a aucun effet sur le développement, le poids corporel, les reins, les hépatocytes (cellules du foie) et les peroxyosomes chez les rongeurs [158]. Le **DEHT** n'est pas génotoxique [159]. Aux doses où le **DEHP**, le **BBP** et le **DINP** ont tous altéré la différenciation

sexuelle, le **DEHT** demeure inactif [4]. Cependant, une diminution du poids corporel de la descendance a été observée dans les deux études [160]. Actuellement il n'y pas de données sur la toxicité des métabolites de **DEHT**.

Selon les études de toxicité chronique, le **DEHA** entraîne une diminution du poids corporel, une augmentation du poids du foie, une augmentation de l'activité enzymatique du peroxyosome et une altération du métabolisme lipidique [161]. Le **DEHA** peut entraîner un faible niveau de génotoxicité chez les larves de poisson-zèbre [162]. Une diminution du poids corporel maternel et de la descendance [163], et un changement histopathologique des ovaires ont également été observés [164]. Par contre, le **DEHA** n'affecte pas l'appareil reproducteur mâle [165]. La toxicité des métabolites du **DEHA** n'est pas connue à ce jour.

Une augmentation du poids du foie et une induction des peroxyosomes hépatiques ont été observés chez les rats [14,166]. Le **TOTM** affecte le cycle cellulaire, le métabolisme lipidique et le processus d'oxydation [167]. En ce qui concerne la toxicité sur la reproduction, le **TOTM** entraîne une diminution du nombre de spermatozoïdes [168] [169]. A ce jour, aucune donnée ne démontre spécifiquement la toxicité des métabolites du **TOTM**.

Les données de toxicité animale du **DINP**, du **DINCH**, du **DEHT**, du **DEHA** et du **TOTM** ainsi de celles de leurs métabolites sont résumées dans les **Tableaux 17, 18, 19, 20, 21**.

**Tableau 16. Données de toxicité du DINP issues d'expérimentations animales.**

Plastifiant	Toxicité aiguë (orale)	Toxicité aiguë (cutanée)	Toxicité aiguë (inhalation)	Irritant/sensibilisant	Toxicité chronique	Génotoxicité	Cancérogénicité	Toxicité sur la reproduction, le développement et effets perturbateurs endocriniens
<b>DINP</b>	Faible DL <sub>50</sub> > 50 mg/k [170]	Faible DL <sub>50</sub> > 3,2 mg/kg [170]	Faible CL <sub>50</sub> > 4,4 mg/L [170]	Légèrement irritant [4] [171] Rougeur au niveau de la conjonctive, quelques sécrétions [172]  Dermatite légère et absence de sensibilisation (humaine) [173]	Augmentation du poids du foie Prolifération des peroxyosomes hépatiques [174]	Négatif [4]	Foie (néoplasie hépatique) Rein (tumeur rénale) Sang (leucémie à cellules mononuclées) [175] [176] [177]	Anomalie de l'appareil reproducteur des mâles et femelles [4] Pas de modification de la fonction du système reproducteur male [149] Anomalies viscérales et squelettiques [150] Diminution et induction de la testostérone [178] [151] [152] [153]

[4] The safety of medical devices containing Dehp scenihr\_o\_047.pdf [Internet]; 2015.  
 [170] Michael A. Babich, Cheryl A. Osterhout; Toxicity review of Diisononyl Phthalate (**DINP**); United States Consumer Product Safety Commission; April 2010.  
 [171] European Council for Plasticisers and Intermediates; Review of Recent Scientific Data on Di-isononyl Phthalate (**DINP**) and Risk Characterisation for its use in Toys and Childcare articles; Technical Report 2009-0601-**DINP**; 2009; 59 pages.  
 [172] European Chemicals Bureau (ECB); European Union Risk Assessment Report. 1,2-benzenedicarboxylic acid, di-C8-10-branched alkyl esters, C9 rich and di"isononyl" phthalate (**DINP**). CAS: 68515-48-0 and CAS: 28553-12-0; EINECS: 271-090-9 and EINECS: 249-079-5. 2nd Priority List, Volume 35. Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau, European Commission; 2003; 289 pages.  
 [173] Brodell RT, Torrence BP; Squish ball dermatitis; Journal of the American Academy of Dermatology 1992; 26: 641-642.  
 [174] Babich MA.; The Risk of Chronic Toxicity Associated with Exposure to DiisononylPhthalate (**DINP**) in Children's Products;  
 [175] Evidence on the carcinogenicity OF Diisononyl Phthalate (**DINP**), Reproductive and Cancer Hazard Assessment Branch. Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency October; 2013.  
 [176] R.Kavlock, K. Boekelheide, R. Chapin, et al ; NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-isononyl phthalate ; Reproductive Toxicology; 16 (2002); 679-708.  
 [177] Lington AW, Bird MG, Plutnick RT, et al.; Chronic toxicity and carcinogenic evaluation of diisononyl phthalate in rats. Fundamental and applied Toxicology 1997; 36:79-89.  
 [149] Clewell RA, Thomas A, Willson G, Creasy DM, Andersen ME; A dose response study to assess effects after dietary administration of diisononyl phthalate (**DINP**) in gestation and lactation on male rat sexual development; Reprod Toxicol; 2013 Jan 1; 35:70-80.  
 [150] Waterman, JL, Ambroso, LH, Keller, et al; Developmental toxicity of di-isodecyl and di-isononyl phthalates in rats. Reprod Toxicol 1999 ;13 :1-6.  
 [178] J. Borch, O. Ladefoged, U. Hass U, et al; Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by **DEHP** and **DINP**, but endocrine effects of **DEHP** are not modulated by **DEHA** in fetal, prepubertal and adult male rats; Reprod. Toxicol 2004 ;18 :53-61.  
 [151] Hannas BR, Lambright CS, Furr J, Howdeshell KL, Wilson VS, Gray LE. Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisooheptyl phthalate, and diisononyl phthalate. Toxicol Sci Off J Soc Toxicol. sept 2011;123(1):206-16.  
 [152] Patyna PJ, Brown RP, Davi RA, Letinski DJ, Thomas PE, Cooper KR, et al. Hazard evaluation of diisononyl phthalate and diisodecyl phthalate in a Japanese medaka multigenerational assay. Ecotoxicol Environ Saf. sept 2006;65(1):36-47.  
 [153] Santangeli S, Maradonna F, Zanardini M, Notarstefano V, Gioacchini G, Forner-Piquer I, et al. Effects of diisononyl phthalate on Danio rerio reproduction. Environ Pollut Barking Essex 1987. déc 2017;231(Pt 1):1051-62  
 DL: Dose létale. CL: Concentration + létale.

**Tableau 17. Données de toxicité du DINCH issues d'expérimentations animales.**

Plastifiant	Toxicité aiguë (orale)	Toxicité aiguë (cutanée)	Toxicité aiguë (inhalation)	Irritant/sensibilisant	Toxicité chronique	Génotoxicité	Cancérogénicité	Toxicité sur la reproduction, le développement et effets perturbateurs endocriniens
<b>DINCH</b>	Faible DL <sub>50</sub> > 5000 mg/kg [4] [179]	Faible DL <sub>50</sub> > 2000 mg/kg [4] [96]	Non déterminée	Faiblement irritant [96] Non sensibilisant	Augmentation du poids du foie, de la thyroïde, des reins  Modification paramètres biologiques [4] [180]	Négatif [4] [180] [168]	Thyroïde (hyperplasie des cellules folliculaires thyroïdiennes et adénome des follicules thyroïdiens) [4]	Diminution de la distance ano-génital]  Diminution de la production d'androgènes  Modifications physiques des vésicules,  Apparition d'une atrophie testiculaire [155]
<p>[4] The safety of medical devices containing Dehp-scenihr_o_047.pdf [Internet]; 2015.            [179] BASF; Safety Data Sheet HEXAMOLL®<b>DINCH</b>®; Version 2; 2014.            [96] National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS); Public report, 1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 1,2-diisononyl ester (Hexamoll <b>DINCH</b>); File No: EX/170 (STD/1259); 2012; 56 pages.            [180] Maag J, Lassen C, Brandt UK, Kjølholt J, Molander L, Mikkelsen SH. Identification and assessment of alternatives to selected phthalates. COWI: Environmental Project No. 1341 2010 Miljøprojekt. Copenhagen; Danish EPA.            [168] Review of Exposure and Toxicity Data for Phthalate Substitutes; Versar, Inc. And Syracuse Research Corporation (SRC); 2010.            [155] Campioli E, Lee S, Lau M, Marques L, Papadopoulos V; Effect of prenatal <b>DINCH</b> plasticizer exposure on rat offspring testicular function and metabolism. Sci Rep ;[Internet]; 11 sept 2017.            DL: Dose létale.</p>								

**Tableau 18. Données de toxicité du DEHT issues d'expérimentations animales.**

Plastifiant	Toxicité aiguë (orale)	Toxicité aiguë (cutanée)	Toxicité aiguë (inhalation)	Irritant/sensibilisant	Toxicité chronique	Génotoxicité	Cancérogénicité	Toxicité sur la reproduction, le développement et effets perturbateurs endocriniens
<b>DEHT</b>	Faible DL <sub>50</sub> > 5 g/kg [4] [180] [168]	Faible DL <sub>50</sub> > 19,68 g/kg [168]	Perte de coordination  Diminution de la mobilité [168]	Faiblement irritant (humain) [181]  Non sensibilisant [168]	Augmentation du poids du foie  Diminution du poids corporel  Modification paramètres biologiques (hémoglobine, hématoците) [157] [158]	Négatif [157]	Non [159]	Diminution du poids corporel maternel et de la descendance [182] [160]

[4] The safety of medical devices containing Dehp -scenihr\_o\_047.pdf [Internet]; 2015.

[180] Maag J, Lassen C, Brandt UK, Kjølholt J, Molander L, Mikkelsen SH; Identification and assessment of alternatives to selected phthalates. COWI; Miljøprojekt. Copenhagen; Danish EPA; Environmental Project No. 1341; 2010.

[168] Review of Exposure and Toxicity Data for Phthalate Substitutes; Versar, Inc. And Syracuse Research Corporation (SRC); 2010.

[181] David RM, Lockhart LK, Ruble KM.; Lack of sensitization for trimellitate, phthalate, terephthalate and isobutyrate plasticizers in a human repeated insult patch test; Food Chem Toxicol 2003; 41:589-93.

[157] Barber ED, Topping DC; Subchronic 90-day oral toxicology of Di(2-ethylhexyl) terephthalate in the rat. Food Chem Toxicol 1995; 33:971-978

[158] Wirnitzer U, Rickenbacher U, Katerkamp A et al.; Systemic toxicity of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHT) in rodents following four weeks of intravenous exposure. Toxicology Letters. 2011 Aug 10;205(1):8-4.

[157] Barber ED (1994). Genetic toxicology testing of di(2-ethylhexyl) terephthalate. Environ Molec Mutagen. 1994; 23:228-233.

[159] James A. Deyo; Carcinogenicity and chronic toxicity of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHT) following a 2-year dietary exposure in Fischer 344 rats; Food Chem Toxicol. 2008;46(3):990-1005.

[182] Faber, Willem D.; Deyo, James A. et al; Two-generation reproduction study of di-2-ethylhexyl terephthalate in CrI:CD rats; Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 2007;80(2):69-81

[160] L. Earl, Gray Jr., Ostby J., et al; Perinatal Exposure to the Phthalates DEHP, BBP, and DINP, but Not DEP, DMP, or DOTP, Alters Sexual Differentiation of the Male Rat; Toxicol. Sciences; 2000; 58(2): 350-36[9]5.

DL: Dose létale.

**Tableau 19. Données de toxicité du DEHA issues d'expérimentations animales.**

Plastifiant	Toxicité aiguë (orale)	Toxicité aiguë (cutanée)	Toxicité aiguë (inhalation)	Irritant/sensibilisant	Toxicité chronique	Génotoxicité	Cancérogénicité	Toxicité sur la reproduction, le développement et effets perturbateurs endocriniens
<b>DEHA</b>	DL <sub>50</sub> > 7,4 à 45 g/kg/poids [4] [183]	DL <sub>50</sub> > 8,4 à 15 g/kg [183]	Non déterminée	Faiblement irritant [4] [183]  Non sensibilisant [161]	Diminution du poids corporel Augmentation du poids du foie Augmentation de l'activité enzymatique du peroxyosome Léthargie Altération du métabolisme lipidique hépatique [161] [162]	Négatif [4] [184]  Faible niveau de génotoxicité [162]	Foie (Carcinome et adénome hépatocellulaire)  [4] [185]	Diminution du poids corporel maternel et descendance [4] [163]  Changement histopathologie des ovaires [164] [186]  Absence de pouvoir toxique sur l'appareil reproducteur mâle [165]

[4] The safety of medical devices containing Dehp-scenih\_r\_0\_047.pdf [Internet]; 2015.  
 [183] Smyth, H.F., Carpenter, C.P., and Weil, C.S; Range-Finding Toxicity Data: List IV, AMA Arch. Ind. Hyg. Occ. Med; (1951); 4;119-122.  
 [161] OECD SIDS BIS(2-ETHYLHEXYL) ADIPATE; [Internet]; 2000.  
 [162] Boran H, Terzi S. Stress-Induced Transcriptional Changes and DNA Damage Associated with Bis(2-ethylhexyl) Adipate Exposure in Zebrafish (Danio rerio) Larvae. Bull Environ Contam Toxicol; 2017 Sep 1; 99(3); 308–14.  
 [184] Reisenbichler H, Eckl PM. Genotoxic effects of selected peroxisome proliferators. Mutat Res Mol Mech Mutagen. 1993 Apr; 286(2);135–44H.  
 [185] NTP National Toxicology Program. Carcinogenesis bioassay of di(2-ethylhexyl) adipate (CAS no. 103-23-1) in F344 rats and B6C3F1 mice. NTP-80-29 NIH Publ. 1982; 81:1768.  
 [163] Dalgaard M, Hass U, Vinggaard AM, et al. Di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) induced developmental toxicity but not antiandrogenic effects in pre- and postnatally exposed Wistar rats; Reprod Toxicol. 2003;17(2):163–170.  
 [186] Wato E, Asahiyama M, Suzuki A, Funyu S, Amano Y. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 9) Effects of 2- or 4-week repeated dose studies and fertility study of di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) in female rats. J Toxicol Sci. 2009;34 Suppl 1:SP101-109.  
 [164] Miyata K, Shiraishi K, Houshuyama S, Imatanaka N, Umano T, Minobe Y, Yamasaki K. Subacute oral toxicity study of di(2-ethylhexyl) adipate based on the draft protocol for the "Enhanced OECD test guideline no. 407";Archives of Toxicology; 2006; 80;181-186.  
 [165] Kang JS, Morimura K, Toda C, Wanibuchi H, Wei M, Kojima N, Fukushima S. Testicular toxicity of DEHP, but not DEHA, is elevated under conditions of thioacetamide-induced liver damage; Reproductive Toxicology ; 2006; 21; 253-259.  
 DL: Dose létale.

**Tableau 20. Données de toxicité du TOTM issus d'expérimentations animales.**

Plastifiant	Toxicité aiguë (orale)	Toxicité aiguë (cutanée)	Toxicité aiguë (inhalation)	Irritant/sensibilisant	Toxicité chronique	Génotoxicité	Cancérogénicité	Toxicité sur la reproduction, le développement et effets perturbateurs endocriniens
<b>TOTM</b>	Faible DL <sub>50</sub> > 2000 mg/kg [4] [168] [166]	Faible DL <sub>50</sub> > 2000 mg/kg [4] [168] [166]	Faible CL <sub>50</sub> > 2600 mg/cm <sup>3</sup> [4] [168] [166]	Sensibilisation non démontrée	Augmentation du poids du foie  Induction des peroxyosomes hépatique [166] [14]	Négatif [4] [168]  Affecte le cycle cellulaire, le métabolisme lipidique, le processus d'oxydation [167]	Non	Testicules déplacées [166]  Diminution de nombre spermatozoïdes et spermatocytes [4] [168] Ostrogénique [169]

[4] The safety of medical devices containing Dehp -scenih\_r\_o\_047.pdf [Internet]; 2015.  
 [168] Review of Exposure and Toxicity Data for Phthalate Substitutes; Versar, Inc. And Syracuse Research Corporation (SRC); 2010.  
 [166] OECD SIDS; SIDS Initial Assessment Report for SIAM 14: Tris (2-ethylhexyl) Benzene-1,2,4-tricarboxylate (CAS 3319-31-1); 2002.  
 [14] Kambia K, Dine T, Gressier B, et al.; Evaluation of the direct toxicity of trioctyltrimellitate (**TOTM**), di(2-ethylhexyl) phthalate (**DEHP**) and their hydrolysis products on isolated rat hepatocytes; Int J Artif Organs 2004;27(11):971-8.  
 [167] Chen X-H, Ma L, Hu Y-X, Wang D-X, Fang L, Li X-L, et al. Transcriptome profiling and pathway analysis of hepatotoxicity induced by tris (2-ethylhexyl) trimellitate (**TOTM**) in mice. Environ Toxicol Pharmacol. 2016 Jan 1; 41:62-71.  
 [169] Ter Veld MGR, Schouten B, Louisse J, et al.; Estrogenic potency of food-packaging-associated plasticizers and antioxidants as detected in ERalpha and ERbeta reporter gene cell lines. J Agric Food Chem 2006; June 14:54(12):4407-16.  
 DL: Dose létale. CL: Concentration létale.

### 3.2.5 Toxicité chez l'homme

Les données de toxicité réalisées chez l'homme sont issues d'études épidémiologiques. Ces études étant longues à réaliser, il est difficile d'établir des liens entre exposition et toxicité.

Plusieurs études de toxicité ont été publiées concernant le **DEHP**. Notre attention se focalise sur l'étude de [23], publiant les premiers résultats sur la DAG (distance anogénitale) chez les garçons. La concentration de métabolites phtaliques affectent plusieurs marqueurs du développement génital chez les garçons [23]. Le **DEHP** impacte également la fonction respiratoire, le métabolisme, et la fonction thyroïdienne chez l'adulte et les enfants [187,188]. Au regard des risques, afin de veiller sur l'exposition au **DEHP** en France, l'étude pilote « Elfe » (Étude longitudinale depuis l'enfance), réalisée en octobre 2007 a permis de recueillir 279 échantillons d'urine chez les mères en salle de naissance. Les résultats des dosages urinaires montrent que les phtalates sont présent chez 100% des femmes avec des concentrations médianes de 41,9 µg/L pour le **5-OH-MEHP**, de 28,3 µg/L en **5-oxoMEHP**, et de 13,7 µg/L en **5-cx-MEHP**.

Une étude réalisée en 2015 montre que le niveau prénatal des métabolites du **DINP** ne semble pas perturber la fonction de reproduction chez les adolescents [192]. Mais d'autres études montrent que le **DINP** et ses métabolites ont un profil douteux qui soulève des inquiétudes concernant le potentiel de perturbation endocrinienne chez l'homme [22,23] et montre une activité anti-oestrogénique [26]. Carl-Gustaf Bornehag et al. 2015 [24] a également mis en évidence une corrélation entre le taux de métabolites du **DINP** (**OH-MMeOP** et **oxo-MMeOP**) et la distance anogénitale chez des garçons suédois de 21 mois. Cette dernière est d'autant plus courte que le taux de métabolites est important, confirmant ainsi les résultats de S. Swann [23], et évoquant des effets perturbateurs endocriniens.

L'étude récente de [26] Anika Engel et al (2018) sur les propriétés endocriniennes potentielles du **DINCH** et de cinq de ses métabolites (mesure de l'activité *in vitro* des récepteurs nucléaires humains ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ ) montre que le **DINCH** n'a aucun impact sur l'activité des récepteurs nucléaires humains. Par contre, ses métabolites affectent les activités des récepteurs aux concentrations de 10 µM. Les résultats concernant l'activation de AR, PPAR $\alpha$  et PPAR  $\gamma$  sont très similaires à ceux obtenus avec le **DEHP**, le **DINP** et leurs métabolites [25]. En ce qui concerne les effets sur les récepteurs ER, les métabolites du **DINCH** montrent une faible activité oestrogénique.

Concernant les études de toxicité humaine du **DEHT**, du **DEHA** et du **TOTM**, très peu de données existent dans la littérature. Deux études chez l'homme montrent que le **DEHT** n'est par irritant après application cutanée [189]. Une seule étude de sensibilisation après 3

semaines d'application cutanée (3 fois par semaine) montre un léger érythème chez les individus exposés au **TOTM** [181].

En conclusion, l'information sur la toxicité chez l'animal des plastifiants alternatifs au DEHP est plus enrichie que sur la toxicité humaine. L'information toxicologique est importante car elle permet de définir de valeurs toxicologiques de référence (DJT ou TDI).

#### Ce qu'il faut retenir

La toxicocinétique permet de décrire le devenir des xénobiotiques comme les plastifiants dans l'organisme. Elle décrit l'absorption, le métabolisme, la distribution et l'élimination (ou ADME) de ces composés. Elle permet également d'identifier leurs métabolites et par la suite la sélection des biomarqueurs spécifiques, leur demi-vie, le temps d'élimination de l'organisme. Les biomarqueurs spécifiques mettent en évidence l'exposition aux effets d'un ou plusieurs plastifiants et caractérisent la réponse d'un organisme soumis à l'exposition. L'identification des biomarqueurs spécifiques des plastifiants permet:

- De les synthétiser pour mener des études de toxicologie plus approfondies
- D'évaluer l'exposition humaine à un plastifiant en développant des méthodes de dosage et permettant ainsi la quantification des biomarqueurs (métabolites spécifiques) dans les prélèvements urinaires (ou autres matrices) *via* les études de biomonitoring.

Les études de toxicité d'un DM sont réalisées selon la norme ISO 10993 contenant plusieurs sous-parties présentées sous le titre général « Évaluation biologique des DM ». Cette norme ne permet pas d'évaluer les risques liés à la toxicité des additifs relargués par les DM dans leurs conditions cliniques d'utilisation. L'étude de leur cytotoxicité *in vitro* sur des cellules murine L929 selon la Partie 5 de la norme EN 10993-5 utilisée pour les DM et simple mais permet d'avoir une première idée de toxicité et ensuite ouverture possible vers d'autres types de toxicités.

La toxicité des plastifiants ajoutés dans les DM doit être réalisée bien avant l'autorisation d'utilisation de ces derniers dans le DM. C'est l'Agence Européenne des produits chimiques, (en anglais, European Chemicals Agency ou ECHA) qui évalue et autorise l'utilisation de produits chimiques. Concernant la toxicité du **DEHP**, les données sont présentes issues d'études toxicologiques chez l'animal et chez l'homme. Selon le règlement REACH les plastifiants alternatifs au DEHP utilisés actuellement dans les DM sont considérés non dangereux pour la santé humaine. Mais n'oublions pas que le règlement européen ne requiert pas d'étude de toxicité des métabolites. Or n'oublions pas que le **MEHP**, métabolite primaire du DEHP, est plus toxique que la molécule mère.

Par ailleurs les métabolites oxydés présentent des effets perturbateurs endocriniens souvent supérieurs à ceux de la molécule mère. Donc afin d'évaluer un produit notamment un plastifiant utilisé, les études de toxicité du plastifiant ainsi que celle de ces métabolites devraient être réalisées.

Actuellement la plupart des études de toxicité des plastifiants alternatifs ou leurs métabolites sont uniquement réalisés chez les animaux. Mais la détermination de la toxicité sur les animaux ne permet pas toujours de prédire la toxicité pour l'homme en raison de la diversité physiologique. L'information toxicologique sur les plastifiants alternatifs au DEHP ainsi que celle de leurs métabolites chez l'homme reste faible. Les études de toxicité devraient s'enrichir car elles permettent de définir les valeurs toxicologiques de référence (DJT ou TDI). Afin de protéger la santé humaine vis-à-vis de l'exposition à une molécule, l'homme ne devrait pas être exposé à des valeurs supérieures à ces DJT.

**2<sup>ème</sup> PARTIE :**

**PARTIE EXPERIMENTALE**

## **ETUDE 1. SYNTHÈSES ET ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE CYTOTOXICITÉ *IN VITRO* DES PLASTIFIANTS ALTERNATIFS ET LEURS MÉTABOLITES PRIMAIRES UTILISÉS DANS LA COMPOSITION DES DISPOSITIFS MÉDICAUX EN PVC PLASTIFIÉ**

### Contexte scientifique de l'étude

Au cours d'interventions de chirurgie cardiovasculaire, de nombreux dispositifs médicaux (DM) sont utilisés telles que des lignes de circulation extracorporelle, des perfuseurs ou encore des prolongateurs. Ces DM sont constitués de matières composites, c'est-à-dire d'un assemblage de deux ou plusieurs produits élémentaires non miscibles de natures différentes. La complémentarité de ces additifs permet d'obtenir un matériau dont les propriétés finales sont meilleures que la matrice initiale en choisissant des compromis au niveau des caractéristiques mécaniques, thermiques ou encore chimiques. Les propriétés recherchées concernant les DM sont plus particulièrement l'élasticité et la flexibilité. Elles sont obtenues par l'ajout de plastifiants de type phtalates qui ne sont pas liés de manière covalente à la matrice. Pendant de nombreuses années, le **DEHP** a été le plastifiant le plus utilisé dans les DM. Il a cependant été démontré par de nombreuses études que ce plastifiant parvenait à migrer de la matrice PVC pour être retrouvé dans le contenu véhiculé par le DM et être relargué dans l'organisme du patient [8–13,27,79–82,86]. Une fois dans l'organisme, ce plastifiant de type diester peut être hydrolysé en un mono-ester (métabolite primaire), puis être oxydé au niveau de la chaîne lipophile (métabolites secondaires). Le **DEHP** est maintenant classé CMR 1B (cancérogène, mutagène ou toxique pour la reproduction) en vertu du Règlement CLP (Union européenne, R 2008) [5] car il présente un danger potentiel pour le patient et son utilisation dans les DM a été progressivement restreinte à un taux limité à 0,1% en masse de **DEHP** [190]. Face à cette directive, le SCENIHR propose des plastifiants alternatifs de type phtalates à longues chaînes alkyle, terephtalates et adipates [4,7] tels que **DINP**, **TOTM**, **DINCH**, **DEHT**, **DEHA** et **ATBC**. Ces plastifiants n'étant également pas liés de manière covalente au PVC, ils ont la capacité de migrer du DM vers le fluide en contact (sang, médicament perfusé) et entrer ainsi en contact avec le patient par voie intraveineuse selon le même processus que le **DEHP**. Donc elles sont également transformées en métabolites primaires et secondaires des plastifiants alternatifs (Tableau 1).

**Tableau 21. Métabolites primaires et secondaires des plastifiants alternatifs.**

Plastifiant	Métabolites primaires	Métabolites secondaires
<b>DEHT</b>	MEHT	5-oxo-MEHTP 5-OH-MEHTP 5-cx-MMHTP 2-cx-MMHTP
<b>DINCH</b>	MINCH MMeOCH	7-oxo-MMeOCH 7-OH-MMeOCH 7-cx-MMeOCH
<b>DINP</b>	MINP MMeOP	7-oxo-MMeOP 7-OH-MMeOP 7-cx-MMeOP
<b>DEHA</b>	MEHA	MEOHA MEHHA
<b>TOTM (ou TEHTM)</b>	1-MEHTM 2-MEHTM 4-MEHTM 1,2-DEHTM 1,4-DEHTM 2,4-DEHTM	2-cx-1-MMHTM 5-OH-1-MEHTM 5-cx-1MEPTM 5-oxo-2-MEHTM 2-cx-2-MMHTM 5OH-2-MEHTM 5cx-2-MEPTM 5-oxo-2-MEHTM

L'évaluation d'un DM devrait ainsi prendre en compte le plastifiant lui-même et ses métabolites primaires et secondaires. Leurs demi-vies varient entre 2,5 et 25 h [16,17,19,21,125,140]. Actuellement, nous savons que le **MEHP** s'avère plus toxique que le plastifiant lui-même [1]. Cependant, il existe peu de données concernant les plastifiants alternatifs et celles de leurs métabolites mis à part les données de toxicité issues d'expérimentations animales [4]. Les effets nocifs de certains portent essentiellement sur la fertilité, le développement du fœtus et du nouveau-né. Le **DEHP** [22,23], le **DINP** et le métabolite primaire du DINCH, le **MINCH** [26] soulèvent également des inquiétudes concernant leur profil éventuel de perturbateur endocrinien chez l'homme. Une étude récente montre également l'effet perturbateurs endocriniens de métabolites secondaires de **DEHT** plus particulièrement celle de **5-OH-MEHT** [191].

Il est à noter que la plupart des métabolites primaires et secondaires utilisés dans ces études scientifiques sont obtenus après administration *per os* ou intraveineuse du plastifiant lui-même à des rongeurs pour ensuite être recueillis *via* des prélèvements urinaires. Les quantités ainsi obtenues sont malheureusement faibles et peuvent constituer un verrou scientifique quant à l'élaboration de plusieurs études biologiques.

Dans le cadre de cette première étude menée lors de nos travaux de thèse, nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à la synthèse des métabolites primaires du **DEHT**, **DINCH**, **DINP**, **TOTM** et **DEHA** de l'ordre de milligrammes (par exemple 2-10 mg).

Par la suite, nous avons mené une étude préliminaire de cytotoxicité sur des cellules fibroblastiques murines L929 selon la norme EN 10993-5 utilisée pour les DM.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication : Eljezi Teuta et al. **In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line.** (2017) *Chemosphere* 173, 452-459 (doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.026).

Remarque : Ces métabolites primaires et secondaires ont également permis d'étalonner les outils analytiques permettant de les quantifier dans les urines des patients recueillies lors de l'étude clinique non interventionnelle approuvée par le Comité de Protection des Personnes CPP Sud-Est VI, AU 1082. Cette méthode analytique a également fait l'objet d'une publication dont nous sommes co-auteur : Pinguet J et al. **New SPE-LC-MS/MS method for the simultaneous determination in urine of 22 metabolites of DEHP and alternative plasticizers from PVC medical devices.** (2019) *Talanta* 198, 377-389 (doi: 10.1016/j.talanta.2019.01.115).

# **IN VITRO CYTOTOXIC EFFECTS OF DEHP-ALTERNATIVE PLASTICIZERS AND THEIR PRIMARY METABOLITES ON A L929 CELL LINE**

**Teuta Eljezi,<sup>a, b, 1</sup> Pierre Pinta,<sup>c, 1</sup> Damien Richard,<sup>d</sup> Jérémy Pinguet,<sup>d</sup> Jean-Michel Chezal,<sup>a</sup> Marie-Christine Chagnon,<sup>e</sup> Valérie Sautou,<sup>b, f</sup> Gaël Grimandi,<sup>c</sup> Emmanuel Moreau,<sup>a, \*</sup>**

<sup>a</sup> Clermont Université, Université d'Auvergne, Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée, BP 184, F-63005 Clermont-Ferrand, France. Inserm, U 990, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Centre Jean Perrin, F-63011 Clermont-Ferrand, France.

<sup>b</sup> CHU Clermont-Ferrand, Pôle Pharmacie, rue Montalembert, 63003 Clermont-Ferrand, France

<sup>c</sup> INSERM, U791, LIOAD, Nantes, F-44042, France Université de Nantes

<sup>d</sup> Service de Pharmacologie, Hôpital Gabriel-Montpied, CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

<sup>e</sup>Nutrition Physiology and Toxicology Team (NUTox), UMR U866 INSERM, Université de Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, 1 esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

<sup>f</sup> Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 4676C-BIOSENS, 63000 Clermont-Ferrand, France.

\* corresponding author: emmanuel.moreau@udamail.fr

<sup>1</sup> both authors contributed equally

## **ABSTRACT**

Phthalic acid esters have been widely used to improve the plasticity of PVC medical devices. They carry a high exposure risk for both humans and the environment in clinical situations. Our study focuses on the cytotoxicity of alternative plasticizers. Postulated primary metabolites were synthesized, not being commercially available. Cytotoxicity assays were performed on L929 murine cells according to the ISO-EN 10993-5 standard design for the biocompatibility of medical devices. The tested concentrations of plasticizers (0.01, 0.05 and 0.1 mg/ml) covered the range likely to be found in biological fluids coming into direct contact with the medical devices. **DEHP**, **DINP** and **DINCH** were cytotoxic at the highest concentration (0.1 mg/ml) for 7 days of exposure. Their corresponding metabolites were found to be more cytotoxic, for the same concentration. By contrast, **TOTM** and its corresponding metabolite **MOTM** were not found to be cytotoxic. **DEHA** showed no cytotoxicity, but its corresponding monoester (**MEHA**) produced a cytotoxic effect at 0.05 mg/ml. In clinical situations, medical devices can release plasticizers, which can come into contact with patients. *In vivo*, the plasticizers are quickly transformed into primary metabolites. It is therefore important to measure the effects of both the plasticizers and their corresponding

metabolites. Standard first-line cytotoxicity assays should be performed to ensure biocompatibility.

## Keywords

Plasticizers, metabolite synthesis; cytotoxicity, DEHP-alternative plasticizers, phthalates

## Abbreviations

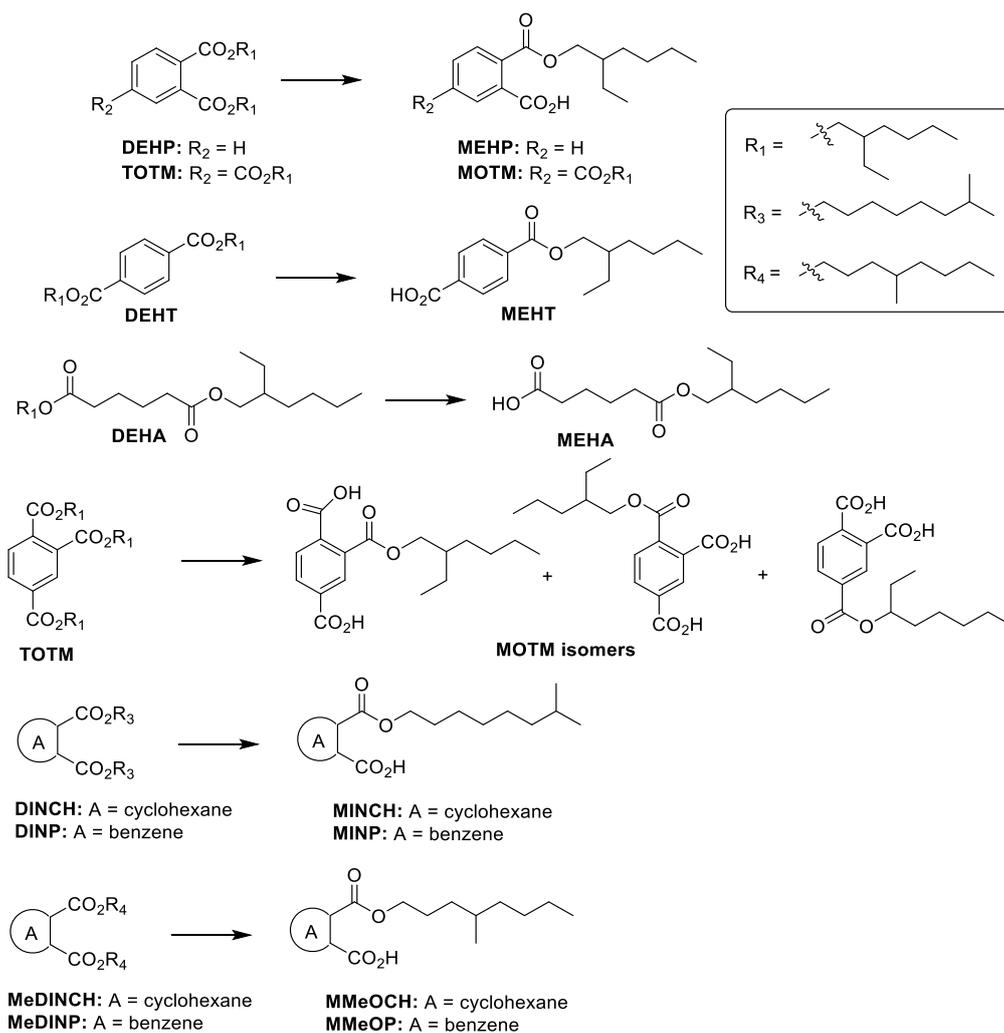
ARMED<sup>®</sup>, Assessment and Risk Management of Medical Devices in Plasticized Polyvinylchloride; **DEHA**, diethylhexyladipate; **DEHP**, diethylhexyl phthalate; **DEHT**, diethylhexylterephthalate; **DINCH**, diisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate; **DINP**, diisononylphthalate; **MEHP**, monoethylhexyl phthalate; **MMeOP**, mono(4-methyloctyl)phthalate; **MMeOCH**, mono(4-methyloctyl) cyclohexane-1,2-dicarboxylate; **MEHT**, monoethylhexylterephthalate; **MINCH**, monoisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate; **MINP**, monoisononylphthalate; **MOTM**, monoethyltrimellitate; **SCENIHR**, Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks; **TOTM**, trioctyltrimellitate.

## 1. INTRODUCTION

PVC (polyvinyl chloride) is widely used in medical devices, in particular to produce flexible tubing such as in infusion sets or extracorporeal circulation lines. To confer and maintain flexibility, plasticizers are added to the PVC matrix. However, it is now generally agreed that plasticizers can migrate from the PVC matrix into infused drug solutions or biological fluids, and thereby come into contact with the patient. Some of these chemicals are likely to be hazardous for patients, as demonstrated for diethylhexyl phthalate (**DEHP**), now classified as CMR 1B (carcinogenic, mutagenic or toxic to reproduction) under the CLP Regulation (European Union, R 2008). It is also well known that the monoethylphthalate **MEHP**, produced *in vivo* by enzymatic hydrolysis of the plasticizer, is even more toxic than the plasticizer itself (ECB, 2004; CRHER, 2005; SCENIHR, 2015). The use of **DEHP** in PVC medical devices was therefore challenged by the European authorities (European Union, R 2007), and in 2012 a French law banned the use of **DEHP** in plasticized PVC medical tubing in neonatology and maternity services as from July 1, 2015 (French law, 2012). Supported by physical and chemical properties, and some animal toxicology data, manufacturers turned to trioctyltrimellitate (**TOTM**), di-ethylhexylterephthalate (**DEHT**), diisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate (**DINCH**), di-isononylphthalate (**DINP**) and diethylhexyladipate (**DEHA**), to replace DEHP in PVC medical devices (Figure 1). However, data on the migration of these additives from medical devices, and on their potential human toxicity are still insufficient.

To be marketed, medical devices have to meet certain essential requirements. These mainly concern their performance, safety, toxicity and biocompatibility. The last three properties concern interactions between tissues in contact with the materials, but other tissues may also be affected. The evaluation of a device has to take into account not only the substances

released from it, but also those derived from their degradation. Lastly, the duration of contact with the body must be considered. To study toxicity and biocompatibility, *in vivo* and *in vitro* tests are proposed in the standard EN ISO 10993. Devices have to undergo tests prescribed according to the level of risk to which patients are exposed. The cytotoxicity test described in EN ISO 10993-5 is mandatory, regardless of the medical device: the authors of the standard consider that the toxicity assessment of a medical device, material or additive on a cell model can be predictive of *in vivo* toxicity. An apparent toxicity in this model does not necessarily demand rejection of the product concerned, but calls for further investigation. Recommended tests depend on the final use of the medical device. For example, an infusion set will not need to meet the same requirements as a central catheter coming directly into contact with blood. Manufacturers mostly test the medical device itself and not the separate materials used in its composition. Secondary materials can include bonding substances and accessories such as fittings. Most often no data is available on the additives used for either the main material or secondary ones. Many additives serve to facilitate the manufacture or use of the medical device: for example, manufacturers often use plasticizers, lubricants or dyes. The biocompatibility of these additives, which affect the ergonomic properties of medical devices, is poorly evaluated. We studied the cytotoxicity of plasticizers added to PVC medical devices using the MTT test, and the cell line (L929 cell line) described in EN 10 993-5. The concentrations studied were those found in biological fluids during direct contact with the medical devices (Takahashi et al., 2008; Kambia et al., 2011; Scenirh 2015; Eckert et al., 2016) Information is lacking on the toxicity of the primary metabolites of **DEHP**-alternative plasticizers. The aim of our study was to assess the toxicity of several such alternative plasticizers and their primary metabolites, with cytotoxicity assays performed according to the EN 10993-5 standard using the MTT assay. The primary metabolites of **TOTM**, **DEHT**, **DEHA**, **DINCH**, **DINP** and **DEHA** are not commercially available, so had to be chemically synthesized. The production of pure metabolites enabled us to study their respective cytotoxicities, and to compare them with that of **MEHP** in the same conditions.



**Figure 1. Plasticizers most often used in medical devices and their corresponding primary metabolites**

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Chemicals, biochemical and reagents

Unless otherwise stated, all manipulations were performed under argon; all reagents were purchased from the following commercial suppliers: Sigma-Aldrich, Acros Organics, Carlo Erba, TCI Europa, and Alpha Aesar. Anhydrous DMF and anhydrous triethylamine were purchased from Acros Organics. THF was distilled over benzophenone and sodium. Dichloromethane was distilled over calcium hydride. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were acquired on a Bruker AC-200 instrument operating at 200 MHz and 50 MHz for  $^1H$  NMR and  $^{13}C$  NMR, respectively. All  $^1H$  NMR spectral peaks are reported in  $\delta$  units, parts per million (ppm), and the coupling constants are indicated in hertz (Hz). The following abbreviations are used for spin multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet,

m = multiplet, and br = broad. The chromatographic system consisted of an HTC PAL autosampler, and a Transcend TLX-1 HTLC System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, United States), The HRMS analysis was performed using a Thermo Exactive benchtop Orbitrap® instrument. TLC was performed on pre-coated silica gel sheets (POLYGRAM® 60F254 plates) and visualized under UV light (254 nm). Column chromatography was performed using silica gel normal phase (35–70 µm). Uncorrected melting points (Mp) were recorded on an Electrothermal IA9300 apparatus. Infrared spectra (IR) were recorded on a Bruker FT Vector 22 instrument.

**DEHP** (Ref: D201154, CAS: 117-81-7), **TOTM** (ref: 538140, CAS: 3319-31-1), **DEHA** (ref: 524197 CAS: 103-23-1), **DINP** (ref: 376663, CAS: 28553-12-0), and **DEHT** (ref: 525189, CAS: 6422-56-2) were purchased from Sigma Aldrich, France. **DINCH** (CAS: 166-412-78-8) was supplied by BASF, France. The primary metabolites **MEHP**, **MEHT**, **MINP**, **MINCH**, **MEHA**, **MMeOP**, **MMeOCH** and **MOTM** were synthesized and characterized by the UMR 990 team, Clermont-Ferrand, France.

Dimethylsulfoxide DMSO (ref: D8418 CAS: 67-68-5), Mouse fibroblasts L929 (ref: 85011425 lot: 10L019), MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, ref: M2128) were also purchased from Sigma Aldrich. Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (fetal calf serum (SVF), phosphate saline buffer (PBS), penicillin (P), streptomycin (S), and actinomycin D were purchased from Life technologies SAS, France.

## 2.2 Methods for the synthesis of primary metabolites

Metabolites **MEHP (3)**, **MOTM (5)**, **MEHA (8)**, **MINCH (19)**, **MINP (21)**, **MeMINCH (30)** and **MeMINP (31)** were synthesized from the appropriate anhydrides **(1a, b)**, **(7)**, **(18)** or **(19)** and the appropriate alcohol derivatives 2-ethylhexanol **(2)**, 7-methyloctanol **(17)** or 4-methyloctanol **(29)** as previously described (F. Nüti et al., 2005). Scheme 1S, 2S, 3S, 5S and 6S depict the synthesis of the primary metabolites listed above (See Supporting Information).

Briefly, to a solution of the appropriate anhydride **(1a, b)**, **(7)**, **(18)** or **(19)** (1 eq.) dissolved in dry pyridine, was added 2-ethylhexanol **(2)**, 7-methyloctanol **(17)** or 4-methyloctanol **(29)** (1 eq.). The resulting mixture was stirred at 125 °C (external temperature) until the anhydride derivative had disappeared (TLC monitoring). The mixture was quenched with cold water (50 mL) and extracted with diethyl ether (8 × 40 mL). The combined organic layer was washed with a 10% solution of hydrochloric acid (100 mL). Finally, the mixture was extracted with 0.4 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 mL). The aqueous basic layer was acidified to pH 1 with a solution of hydrochloric acid (1M) and then extracted with Et<sub>2</sub>O (4 × 100 mL). The combined organic layer was washed with brine (150 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure.

The metabolite **MEHT (12)** was obtained by esterification of the terephthalate derivative **(11)** and 2-ethylhexanol **(2)** (See Supporting Information, scheme 4S, **Annex 1**).

## **2.3 Biocompatibility assays**

### **2.3.1 Solubilization of the plasticizers**

All the plasticizers and their metabolites were solubilized in DMSO (stock solutions) at 1% concentration (10 mg/mL). The final concentrations of the respective stock solutions were checked by GC-MS (Supporting Information, Table S1). Work solutions of each plasticizer were obtained by dilution of the stock solutions to the concentrations 0.01 mg/ml (0.1%); 0.05 mg/ml (0.5%) and 0.1 mg/ml (1%) in the culture medium (DMEM).

### **2.3.2 Cells cultures**

L929 cells were cultured in 96-well plates (without plasticizers) with DMEM supplemented with 10% of SVF, 100 IU/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin (complete DMEM) at 37°C with 5% of CO<sub>2</sub>.

### **2.3.3 MTT assay procedure**

The MTT reagent was used at a concentration of 5 mg/mL in PBS. At the end of the cell cultures, the media were removed, and 30 µL of the MTT reagent was added to each well. Cells were then incubated for 3 h at 37 °C with 5% of CO<sub>2</sub>. The MTT reagent was removed, and 200 µL of dimethyl sulfoxide was added to each well (multiwell plates without plasticizers). After 1 h of formazan dissolution, the optical density (OD) of each well was measured at 570 nm (spectrophotometer VICTOR™ Multilabel HTS Counter PerkinElmer).

### **2.3.4 Specificity of the MTT assay**

L929 cells were seeded in triplicate at 10<sup>4</sup> cells/well. After 24 h, the medium was replaced by 200 µL of the complete DMEM (control) or 200 µL of the complete DMEM supplemented with 0.1% of actinomycin D. Cells were then cultured for 5 days with a medium change every day. MTT assays were performed every day for each condition. Cell viability percentage was calculated using the formula: ((OD test – OD control) / OD control).

### **2.3.5 Linearity of the MTT assay**

L929 cells were seeded in triplicate at increasing numbers of cells per well (5×10<sup>3</sup> - 10×10<sup>3</sup> - 50×10<sup>3</sup> - 100×10<sup>3</sup> - 150×10<sup>3</sup> - 200×10<sup>3</sup> - 250×10<sup>3</sup> - 300×10<sup>3</sup> - 350×10<sup>3</sup>) in 96-well plates. After 8 h of adherence, the MTT assay was performed as described above.

### **2.3.6 Viability assay for the DMSO solvent**

According to the work plasticizer solutions, L929 cells were cultured in complete DMEM supplemented with 0.1%, 0.5%, 1%, 2.5% and 5% of DMSO. Cells were seeded in triplicate at 10<sup>4</sup> cells/well. After 24 h, the medium was replaced every day by 200 µL of the complete

DMEM for the control and 200  $\mu$ L of the complete DMEM supplemented with DMSO at the selected concentrations. Cells were cultured for 7 days. An MTT assay was performed every day according to the MTT assay procedure.

### 2.3.7 Viability assays for the plasticizers

For the viability assay of the plasticizers, cells were seeded in triplicate at  $10^4$  cells/well. After 24 h, the media were replaced by 200  $\mu$ L of the followings solutions: (i) control conditions with complete medium, (ii) control DMSO conditions with the complete medium supplemented with the same concentration of DMSO as the plasticizer work solutions, and (iii) work solutions (0.1%, 0.5 % and 1%) of the plasticizers. Cells were cultured for 7 days with a medium change every day. MTT assay and quantification of the viability percentage were carried out every day.

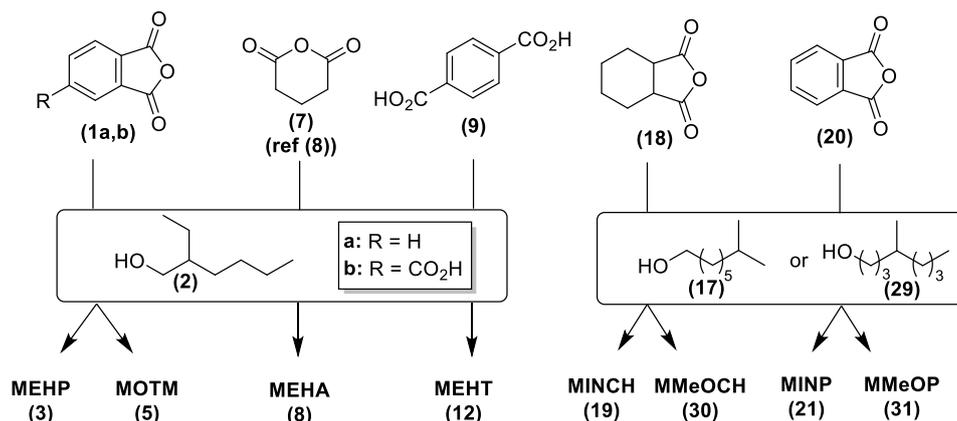
### 2.3.8 Statistical analysis

The experiments performed in triplicate were repeated at least twice, and the outcomes of one representative data set of each plasticizer are reported. Differences in viability percentages between the control conditions and the test conditions were analyzed using the Mann-Whitney non-parametric test. A *p* value less than 0.05 was considered significant.

## 3. RESULTS

### 3.1 Synthesis of metabolites

Primary metabolites **MEHP (3)** (F. Nüti et al., 2005), **MOTM (5)**, **MEHA (8)**, **MINCH (19)**, **MINP (21)**, **MMeOCH (30)** and **MMeOP (31)** were synthesized by esterification of the appropriate anhydride ((**1a**, **b**), (**7**), (**18**) and (**20**)) by the appropriate alcohol: 2-ethylhexanol (**2**), 7-methyloctanol (**17**) or 4-methyloctanol (**29**) (Figure 2) as previously described (Nüti et al., 2005). For **MOTM**, a condensation of anhydride (**1b**) and (**2**) yielded a mixture of two isomers, which was not separated. **MEHA (8)** was straightforwardly obtained from anhydride (**7**) (Cisneros, 2012) and alcohol (**2**) with good yield. We also synthesized the **MEHT** metabolite. Starting material terephthalic acid (**9**), after protection with benzyl bromide, then treatment with thionyl chloride followed by an esterification with (**2**), and a final catalytic hydrogenation, afforded **MEHT (12)**.



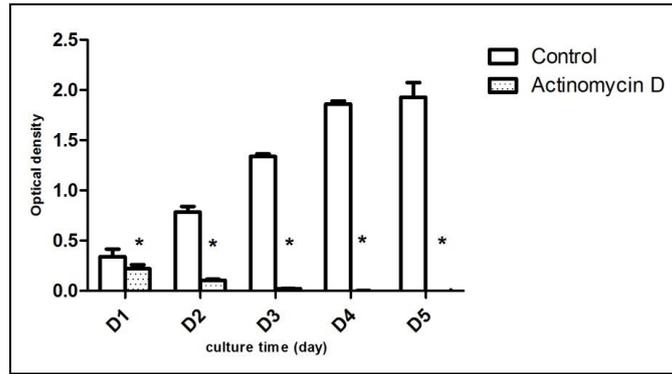
**Figure 2. Access to MEHT, MEHA, MOTM, MINCH, MINP, MMeOCH and MMeOP from 2-ethylhexanol (2), 7-methyloctanol (17) or 4-methyloctanol (29).**

**MINCH** and **MINP** were obtained by condensation of 7-methyloctan-1-ol (**17**) and dihydro-2H-pyran-2,6-(3H)-dione (**18**) or hexahydroisobenzofuran-1,3-dione (**20**), respectively. Compound 7-methyloctan-1-ol (**17**) was commercialized, but was very costly. We therefore synthesized it in four steps as described in Scheme 5S. **MMeOCH** and **MMeOP** were obtained by a similar procedure with 4-methyloctan-1-ol (**29**) (Scheme 6S). All intermediates and final compounds were analyzed by IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and HRMS. For all details, see Supporting Information in **Annex 1**. The purity of all our synthesized metabolites and their corresponding intermediates exceeded 95%.

### 3.2 Biocompatibility assay

#### 3.2.1 Specificity of MTT assay

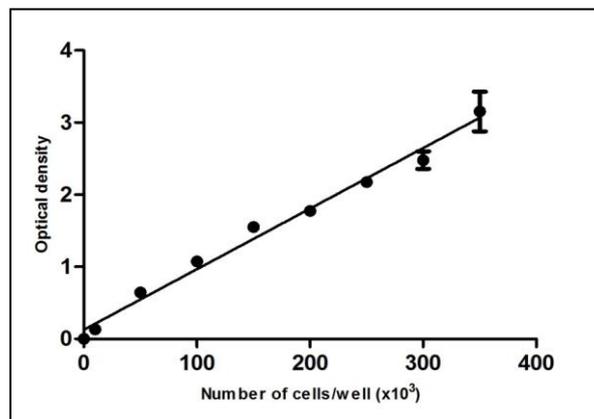
Figure 3 shows the optical density obtained after MTT assay on L929 cells cultured in complete medium with and without actinomycin D for 5 days. The optical density of control wells gradually increased from D1 to D5; L929 cells proliferated normally. The optical density in the wells cultured in the presence of actinomycin D fell significantly from D1 compared with the control, and tended to zero at D3. The apoptosis-inducing effect of actinomycin D (Kleeff et al., 2000) time-dependently caused cell death, which was close to 100% at D3 in the MTT assay.



**Figure 3. Specificity of the MTT assay.** Optical density of the control wells vs. the optical density of the actinomycin D wells. L929 cells were seeded at 104 cells/well, and cultured in Complete DMEM with and without actinomycin D (0.1%) for 5 days. MTT assays were carried out every day for each condition. \* $p < 0.05$  control vs. test (DMEM + %DMSO).

### 3.2.2 Linearity of MTT assay

Figure 4 shows the linearity of the MTT assay. A linear correlation ( $r^2 = 0.9812$ ) was found between the number of seeded cells and the optical density obtained at the end of the MTT assay after 8 h of adherence.



**Figure 4. Linearity of MTT assay.** L929 cells were seeded at increasing numbers of cells per well ( $10 \times 10^3$  -  $50 \times 10^3$  -  $100 \times 10^3$  -  $150 \times 10^3$  -  $200 \times 10^3$  -  $250 \times 10^3$  -  $300 \times 10^3$  -  $350 \times 10^3$ ) in complete medium. After 8 h of adherence, the MTT assay was performed for each well.

### 3.2.3 DMSO solvent effect on cell viability

Figure 5 shows the proliferation of L929 cells cultured in complete medium with and without DMSO (0.1%, 0.5%, 1%, 2.5% and 5%) for 7 days. There was no significant difference in cell proliferation between control (DMEM) and the cells cultured in DMEM supplemented with 0.1% and 0.5% of DMSO. Cells cultured in DMEM supplemented with 1% of DMSO proliferated for the 7 days of culture, but their proliferation was significantly lower than that of the control. Beyond 1% of DMSO, L929 cells did not proliferate.

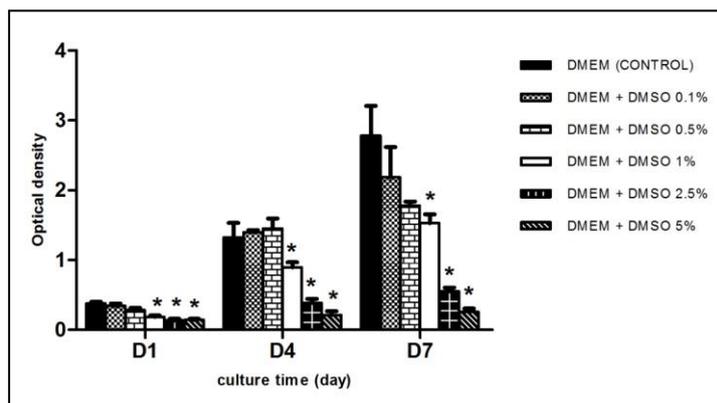
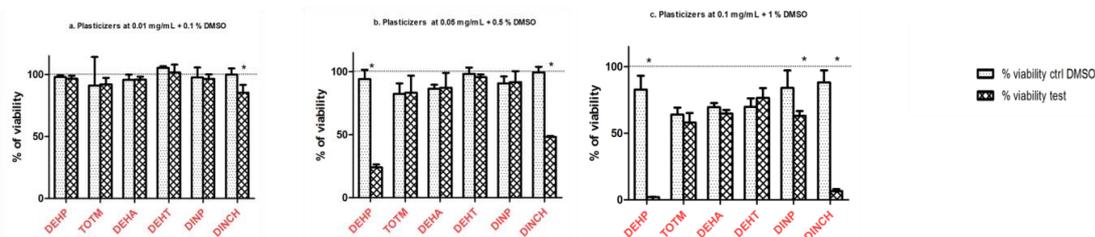


Figure 5. Viability assays of the solvent DMSO. L929 cells were seeded at  $10^4$  cells/well, and cultured in complete medium with and without DMSO (0.1%, 0.5%, 1%, 2.5% and 5%) for 7 days. MTT assay was carried out every day. \* $p < 0.05$  control vs. test (DMEM + %DMSO).

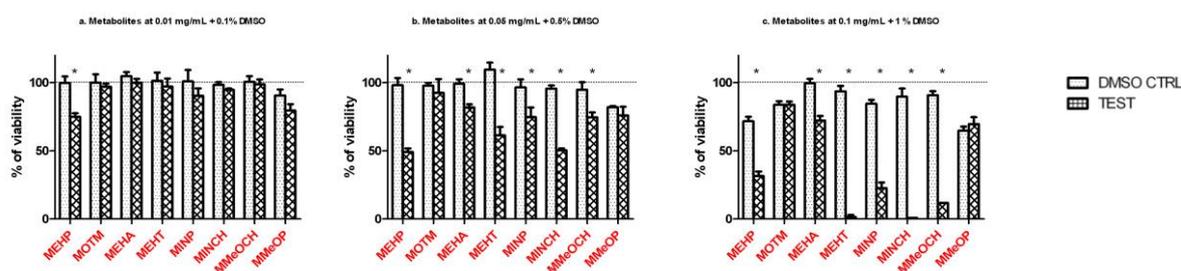
### 3.2.4 Viability of cells when exposed to the plasticizers and their primary metabolites

Figure 6 shows the results of viability tests, at day 7 (D7), performed on L929 cells cultured in the presence of three concentrations of plasticizers after 7 days of contact. Plasticizers were not toxic to the cells at the concentration of 0.01 mg/ml compared with the control containing DMSO at the same concentration. A decrease in cell viability was observed for **DEHP** and **DINCH** from the concentration of 0.05 mg/mL. For these two plasticizers, this decrease in viability was higher than 50%. **DINP** reduced cell proliferation from a concentration of 0.1 mg/mL (40%). For the other plasticizers (**TOTM**, **DEHA** and **DEHT**), there were no significant differences compared with DMSO at any of the three concentrations tested.



**Figure 6. Cytotoxicity test of plasticizers at 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL and 0.1 mg/mL, day 7. Outcomes of the cell viability analysis using MTT assay. L929 cells were seeded at  $10^4$  cells/well and cultured for 7 days in three conditions with medium change every day: control (complete medium), control DMSO (complete medium supplemented with DMSO 0.1%, 0.5% and 1%) and test (work solutions of plasticizer in complete medium at 0.1% (0.01 mg/mL), 0.5% (0.05 mg/mL) and 1% (0.1 mg/mL)). MTT assay and quantification of the viability percentage were carried out every day.  $*p < 0.05$  DMSO control vs. Test.**

Figure 7 depicts the results of the viability tests on primary metabolites of the plasticizers. From 0.01 mg/mL, only **MEHP** had an impact on cell growth. **MEHP** expressed a cytotoxicity of 50% and 70% respectively at 0.05 mg/mL and 0.1 mg/mL. Compared with **MEHP**, the effect on the L929 proliferation was different for all the other primary metabolites studied except for **MINCH** and **MEHT**: at 0.05 mg/mL, these latter were as cytotoxic as **MEHP** (about 50% cell death). From 0.1 mg/mL, they were much more cytotoxic than **MEHP** (98% and 99% of cell death observed for **MEHT** and **MINCH**, respectively versus 70% for **MEHP**). For **MMeOCH**, a structural isomer of **MINCH**, results were close to those obtained for **MINCH** from 0.05 to 0.1 mg/mL. By contrast, the **MMeOP**, a structural isomer of **MINP**, never significantly decreased cell viability at any of the concentrations tested. For **MOTM**, no significant decrease in proliferation was observed compared with the DMSO control at any of the concentrations tested. **MEHA** was weakly toxic, its cytotoxicity lying in the range 20–30% at 0.05 and 0.1 mg/mL, respectively.



**Figure 7. Cytotoxicity test of primary metabolites at 0.01 mg/mL (a), at 0.05 mg/mL and at 0.1 mg/mL, day 7. Outcomes of the cell viability analysis using MTT assay. L929 cells were seeded at  $10^4$  cells/well and cultured for 7 days in three conditions with medium change every day: control**

(complete medium), control DMSO (complete medium supplemented with DMSO 0.1%, 0.5% and 1%) and test (work solutions of plasticizer in complete medium at 0.1% (0.01 mg/mL), 0.5% (0.05mg/mL) and 1% (0.1 mg/mL). MTT assay and quantification of the viability percentage were carried out every day. \* $p < 0.05$  DMSO control vs. Test.

In summary, we observed that **MOTM** and **MMeoP** were not cytotoxic at any of the concentrations tested. **MEHA** was weakly cytotoxic. **MEHP**, **MEHT**, **MINP**, **MINCH** and **MMeOCH** were cytotoxic with a concentration effect.

#### 4. DISCUSSION

Since the plasticizer **DEHP** was classified as CMR 1B, manufacturers have used various alternative plasticizers with high molecular weights or different solubility properties, such as other phthalates, trimellitates, citrates, alkyl sulfonic phenyl esters (ASEs), C10-21-alkanes, acetylated monoglycerides of hydrogenated castor oil (COMGHAs), or acetates. In PVC medical devices, the plasticizers most commonly added are **TOTM** and **DINCH**, but **DINP** and **DEHA** are also frequently found. **DEHT** is seldom used in MDs as the main plasticizer, but it is also a contaminant of **TOTM** (Gimeno et al., 2014, Bourdeaux et al., 2016). Here we focus on plasticizers commonly used in medical devices. Special attention was of course paid to all phthalate substitutes because of their endocrine-disrupting and reprotoxic properties. Except for **TOTM**, there are many studies on alternative PVC plasticizers used by manufacturers. For **DEHA**, carcinogenic properties were observed toward female B6C3F1, and a disturbance of the estrous cycle and increased ovarian follicle atresia were detected in rats (Miyata et al., 2006). For **DEHT**, no effects were reported on reproductive tissues, organs, kidneys, liver hepatocytes or peroxisomes, which are known targets of **DEHP**-toxicity (Wirnitzer et al., 2011; Deyo, 2008). **DINP** and **DINCH** have been studied more thoroughly. Levels of **DINP** exposure are far below those that have no observed adverse effects in animals, and also below health-based exposure guidance values set by regulatory authorities and other authoritative bodies as acceptable (Borch et al., 2004; Patynaa et al., 2006; Kransler et al., 2012). **DINCH** has been studied by Schütze and co-workers. **DINCH** is neither a reproductive toxicant nor an endocrine disruptor in rodents. Thyroid hyperplasia and signs of renal toxicity were only observed at relatively high dose levels in animals of either sex (Schütze et al., 2015; Schütze et al., 2014).

Until now, all these numerous studies have estimated the kinetics of metabolism of **DEHP** from the urinary excretion of its main primary and secondary metabolites, or the parent substance, after administration of the PVC plasticizer (Fromme et al., 2016; Schütze et al., 2012, 2014; Anderson et al., 2011; Koch et al., 2011, 2012, 2013). For other studies, analyses were conducted using deuterated plasticizers (D2 or D4-DEHP, D2 or D4-DINCH, D2 or D4-DINP): after administration to mice, urine samples were analyzed by LC-MS to measure metabolite concentrations (Anderson et al., 2001, 2011; Koch et al., 2005, 2007).

Besides these results, the literature reports that plasticizers are metabolized *in vivo*. In a first metabolism step, they are cleaved into monoesters (or diester for **TOTM**), which are further oxidized in various ways into alcohol, ketone or acid derivatives. These secondary metabolites are recovered in urine (Martis et al., 1987). These metabolites are not all currently available on the market, and several were produced after oral or intravenous administration of the plasticizers to animals and collected as glucuronated derivatives. Primary and secondary metabolites were obtained by hydrolysis of these derivatives. The low quantities obtained by these methods do not always allow full cytotoxicity studies. To overcome this limitation, we undertook here for the first time the total synthesis of the postulated primary metabolites of these plasticizers, namely **MOTM**, **MEHA**, **MEHT**, **MINP**, **MINCH**, **MMeOP** (isomer of MINP) and **MMeOCH** (isomer of MINCH) as they are described in the literature.

All the primary metabolites were successively synthesized (for details, see Figure 2 and supplementary material in **Annex 1**). The synthesized metabolites were chemically conformant (purity 95%), and so the results of the cytotoxicity assays can be considered as reflecting the synthesized substance and not impurities. The objective of our preliminary work was to compare the effect of these plasticizers and their metabolites on the *in vitro* cell culture models used to evaluate the biocompatibility according to the EN 10993. However, authors report difficulties applying the EN 10993-5 standard for plasticizers: these substances are hydrophobic, and cannot be used as they are for direct contact in a culture medium. It is therefore necessary to use a solvent for these materials, which is itself non-cytotoxic toward the cells, to perform the tests. DMSO was used for this purpose (Wang et al., 2012). Solubility tests showed that the plasticizers were soluble up to a concentration of 1% in DMSO (data not shown). We validated the DMSO maximum concentrations that can be used in the presence of L929 according to our experimental protocol (7 days of cell culture at an initial cell density of  $10^4$  cells/well). DMSO could thus be used up to a maximum concentration of 1%. To avoid bias, all tests were compared with a control DMSO (medium supplemented with DMSO at the same concentration).

All the plasticizers and their corresponding primary metabolites were cultured directly with murine L929 fibroblasts at three different concentrations (0.01, 0.05 and 0.1 mg/mL) for 7 days. Concerning cytotoxicity of plasticizers, no effect was observed at 0.01 mg/mL. **DEHP** and **DINCH** caused a decrease in L929 cell proliferation from the concentration of 0.05 mg/mL, and their effect was massive at the highest concentration, with total cell death. **DINCH** was as toxic as **DEHP** for the L929 fibroblast cells. These results were unexpected because the chemical structures of the two substances are widely different. **DEHP** is a phthalate with two ethylhexanyl chains, whereas **DINCH** has no aromatic scaffold, and two more lipophilic chains grafted on the ester function. Except for **DINP**, which caused cell proliferation inhibition (20–30%) from 0.1 mg/mL, all the other plasticizers (e.g. **TOTM**, **DEHA** and **DEHT**) showed no significant differences compared with DMSO at any of the three concentrations tested. By

contrast, **TOTM**, one of the most widely used alternative plasticizers, though banned in food applications, presented a favorable toxicity profile. If we consider the cytotoxicity threshold described in the standard EN 10993-5, **DEHP** and **DINCH** were equivalent in terms of cytotoxicity (viability threshold < 70%).

These results show a clear difference in the cytotoxicities of the plasticizers evaluated. Köksal et al. studied the cytotoxicity of cyclohexyl butyl phthalate (BHP) with the MTT assay on L929 cell lines. They found an ICC at 0.29 µg/ml for BHP. (Köksal et al., 2016). Alternative plasticizers evaluated in our study showed significantly lower cytotoxicities. The most cytotoxic (except for **DEHP**) did not lower cell viability at a concentration of 0.01 mg/ml, 30 times higher than the IC50 of BHP.

Concerning the primary metabolites of the PVC plasticizers, their effects on L929 cell viability were very different when they were tested at the same three concentrations. From 0.05 mg/mL, all the metabolites were cytotoxic except for **MOTM**. **MEHT** and **MINCH** were as toxic as **MEHP**. Their corresponding parent plasticizers (**DEHT** and **DINCH**) had no effect at this concentration. At 0.1 mg/mL, **MEHT** and **MINCH** were as toxic as **DEHP** and more toxic than **MEHP**. **MINP** was weakly toxic at 0.05 mg/mL, but cell viability fell sharply at 0.1 mg/mL to reach 80% cell death, i.e. more toxic than **MEHP** and with an effect similar to that observed with **DEHP**. The isomer of **MINCH** (**MMeOCH**) had a similar cytotoxic activity at 0.05 mg/mL (15% cell death), but was also more toxic than **MEHP** and behaved like **DEHP** at 0.1 mg/mL.

The metabolization of plasticizers increases their cytotoxicity. For example, in the literature, **MEHP**, the **DEHP** bioactive metabolite (Frederiksen et al., 2007), was shown to be 10 times more potent than **DEHP** (Huber et al., 1996). **MEHP** is a well-known activator of the PPAR family of nuclear receptors (Hurst and Waxman, 2003; Maloney and Waxman, 1999). The toxicities of the other metabolites are not well known. A recent study reports that **MINCH** (50, 100 µM) like **MEHP** (50µM), is also a potential PPAR-α agonist and a metabolic disruptor, able to induce SVF preadipocyte differentiation, which may interfere with the endocrine system in mammals (Campioli et al., 2015). The implications of primary metabolite toxicities higher than that of plasticizers themselves depend on the *in vivo* metabolism and species. This information is not available, and so there is a need to perform *in vivo* animal toxicity studies on primary and secondary metabolites identified for each plasticizer. Koch et al. (2013) have measured the amount of **MINCH** excreted in urine after oral absorption of **DINCH**. However, they do not report the absorption percentage of **MINCH**, its metabolism rate, or the rate of metabolization of **MINCH** to its secondary metabolites (**Cx-MINCH**, **OH-MINCH** and **OXO-MINCH**). The value of 1% for **MINCH** measured in urine is therefore not predictive of the amount of **MINCH** formed and excreted from the vascular system. The literature shows that absorption of plasticizers after oral exposure is very low in rodents (50% for **DEHP** (Anderson et al., 2011)).

## 5. CONCLUSION

The main finding of our study is that **TOTM** showed lower toxicity on L929 cells than the other plasticizers. Its primary metabolite, **MOTM**, did not display any toxicity compared with the other metabolites. This finding is important because we recently demonstrated a predominance of **TOTM** in 32 PVC medical devices, accompanied by some **DEHP** (<0.1% w/w), **DEHT**, and sometimes **DEHA** (Bourdeaux et al., 2016). Under conditions appropriate for obtaining biosimilar model results, **TOTM** thus presents a favorable profile as a plasticizer for medical devices. Our results still have to be interpreted and correlated with plasticizer extraction tests performed in clinical conditions of use. An infusion set used once in the life of a patient for 24 hours presents a lower risk than a hemodialysis circuit used for 4 hours three times a week. Hence to assess patient exposure risk, it will be necessary to determine the amount of plasticizer extracted per unit mass of PVC in clinical conditions. Such work is particularly necessary for medical devices used for vascular access. One objective of the ARMED project is to propose a migration simulation model (Bernard et al., 2015): the SCENIHR 2015 reported different migration profiles among plasticizers. Given the primary metabolite toxicities of several DEHP alternatives (**MEHT**, **MINP**, **MINCH** and **MMeOCH**), it will also be necessary to look for the presence of their secondary metabolites, and study their toxicities.

### Declaration of interest

This study is a part of the ARMED® project, and received financial support from the French National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (ANSM).

## REFERENCES

1. W. A. Anderson, L. Castle, S. Hird, J. Jeffery, M. J. Scotter. 2011. A twenty-volunteer study using deuterium labelling to determine the kinetics and fractional excretion of primary and secondary urinary metabolites of di-2-ethylhexylphthalate and di-isononylphthalate. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2022-2029.
2. L. Bernard, R. Cueff, M. Chagnon, F. Abdoulouhab, B. Décaudin, C. Breysse, S. Kauffmann, B. Cosserant, B. Souweine, V. Sautou, ARMED study group. 2015. Migration of plasticizers from PVC medical devices: Development of an infusion model. *Int. J. Pharm.* 15, 494, 136-145.
3. J. Borch, O. Ladefoged, U. Hass, A. M. Vinggaard. 2004. Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. *Reprod. Toxicol.* 18, 1, 53-61.
4. D. Bourdeaux, M. Yessaad, P. Chennell, V. Larbre, T. Eljezi, L. Bernard, V. Sautou, ARMED study group. 2016. Analysis of PVC plasticizers in medical devices and infused solutions by GC-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 118, 206-213.
5. E. Campioli, T.B.Duong, F. Deschamps, V. Papadopoulos. 2015. Cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid diisononyl ester and metabolite effects on rat epididymal stromal vascular fraction differentiation of adipose tissue. *Environ. Res.* 140, 145-156.

6. CERHR, (Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction) NTP-CERHR Expert
7. Panel Update on the Reproductive and Developmental Toxicity of Di(2-ethylhexyl)phthalate. 2005.
8. J. A. Cisneros, E. Björklund, I. González-Gil, Y. Hu, A. Canales, F. J. Medrano, A. Romero, S. Ortega-Gutiérrez, C. J. Fowler, M. L. López-Rodríguez. 2012. Structure-activity relationship of a new series of reversible dual monoacylglycerol lipase/fatty acid amide hydrolase inhibitors J. Med. Chem. 55, 824-836.
9. J. A. Deyo. 2008. Carcinogenicity and chronic toxicity of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHT) following a 2-year dietary exposure in Fischer 344 rats. Food Chem. Toxicol. 46(3), 990-1005.
10. ECB, (European Chemical Bureau) European Union Risk Assessment Report for Bis(2-ethylhexyl) phthalate. consolidated final report, 2004.
11. E. Eckert , F. Münch , T. Göen , A. Purbojo , J. Müller , R. Cesnjevar . 2016. Comparative study on the migration of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and tri-2-ethylhexyltrimellitate (TOTM) into blood from PVC tubing material of a heart-lung machine. Chemosphere. 145, 10-16.
12. European Union, DIRECTIVE 2007/47/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL amending Council Directive 90/385/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to active implantable medical devices, Council Directive 93/42/EEC concerning medical devices and Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market.5 September 2007.
13. EC (European Union, R., The European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation 2008. 1272 / 2008.
14. NF EN 10993-5 Cytotoxicity assay. 2009.
15. NF EN 10993 Biological evaluation of medical devices. 2009.
16. French law n° 2012-1442 of december 24,2012 to the suspension of the manufacture, import, export and placing on the market of any specializing in food packaging containing bisphenol A Journal Officiel de la République Française. 0300 (26 December 2012): p. 20395.
17. Frederiksen H.,Skakkebaek N.E., Andersson A.M. Metabolism of phthalates in humans. Mol.Nutr.Food Res. (2007) 51, 899–911.
18. H. Fromme, A. Schütze, T. Lahrz, M. Kraft, L. Fembacher, S. Siewering, R. Burkardt, S. Dietrich, H.M. Koch, W. Völkel. 2016. Non-phthalate plasticizers in German daycare centers and human biomonitoring of DINCH metabolites in children attending the centers (LUPE 3). Int. J Hyg. Environ. Health. 219, 33-39.
19. P. Gimeno, S. Thomas, C. Bousquet, A. F. Maggio, C. Civade, C. Brenier, P. A. Bonnet. 2014. Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC-MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 949-950, 99-108.
20. Huber W.W., Grasl-Kraupp B., Schulte-Hermann R. 1996. Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. Crit. Rev. Toxicol. 26, 365–481.

21. Hurst C.H., Waxman D.J. 2003. Activation of PPAR alpha and PPAR gamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicol.Sci.* 74, 297–308.
22. N. Kambia, T. Dine, B. Gressier, B. Frimat, J. L. Cazin, M. Luyckx, C. Brunet, L. Michaud, F. Gottrand. 2011. Correlation between exposure to phthalates and concentrations of malondialdehyde in infants and children undergoing cyclic parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 35, 395-401.
23. J. K. M. Kleeff, H Sawhney, M. Korc. 2000. Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. *Int. J. Cancer* 86,399-407.
24. H. M. Koch, H. M. Bolt, R. Preuss, J. Angerer. 2005. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* 79 367-376.
25. H. M. Koch, J. Angerer. 2007. Di-iso-nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine after a single oral dose of deuterium-labelled DINP. *Int. J Hyg. Environ. Health.* 201, 9-19.
26. H. M. Koch, A. Schütze, C Pälme, J. Angerer, T. Brüning. 2013. Metabolism of the plasticizer and phthalate substitute diisononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) in humans after single oral doses. *Arch. Toxicol.* 87, 799–806.
27. K. M. Kransler, A. N. Bachman, R. H. McKee. 2012. A comprehensive review of intake estimates of di-isononyl phthalate (DINP) based on indirect exposure models and urinary biomonitoring data. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62, 2, 248-256.
28. Ç. Köksal, A. Nalbantsoy, N. Ü. Karabay Yavaşoğlu. 2016. Cytotoxicity and genotoxicity of butyl cyclohexyl phthalate. *Cytotechnology.* 68, 213-222.
29. S. Lakshmi, A. Jayakrishnan. 1998. Migration resistant, blood-compatible plasticized polyvinyl chloride for medical and related application. *Artif. Organs* 22, 222-229.
30. E.K. Maloney, D.J. Waxman. 1999. Trans-Activation of PPAR alpha and PPAR gamma by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 161, 209–218.
31. Martis, Leo; Freid, E.; Woods, E. 1987. Tissue distribution and excretion of tris-(2-ethylhexyl) trimellitate in rats. *J. of Toxicol. Environ. Health* 20, 4, 357-366.
32. K. Miyata, K. Shiraishi, S. Houshuyama, N. Imatanaka, T. Umamo, Y. Minobe, K. Yamasaki. 2006. Subacute oral toxicity study of di(2-ethylhexyl)adipate based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline no. 407". *Arch Toxicol.* 80, 4, 181-186.
33. F. Nuti, S. Hildenbrend, M. Chelli, R. Wodarz, A. M. Papini. 2006. Synthesis of DEHP metabolites as biomarkers for GC-MS evaluation of phthalates as endocrine disrupters. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 3461-3465.
34. P.J. Patynaa, R.P. Brownb, R.A. Davib, D.J. Letinskib, P.E. Thomasa, K.R. Coopera, T.F. Parkertonb. 2006. Hazard evaluation of diisononyl phthalate and diisodecyl phthalate in a Japanese medaka multigenerational assay; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 1, 36-47.
35. Réglementation REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals). Juin 2007.
36. N. N. Reddy, Y. M. Mohan, K. Varaprasad, S. Ravindra, K. Vimala, K. M. Raju. 2010. Surface Treatment of Plasticized Poly(vinyl chloride) to Prevent Plasticizer Migration *J. Appl. Polym. Sci.* 115, 1589-1597.

37. SCENIHR, (Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks) opinion on the safety of medical devices containing dehp- plasticized pvc or other plasticizers on Neonates and other groups possibly at risk (2015 update).
38. C. Schütze, J. Pälme, Angerer, T. Weiss, T. Brüning, H. M. Koch. 2012. Quantification of biomarkers of environmental exposure to di(isononyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) in urine via HPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 895-896, 123-130
39. Schütze, M. Kolossa-Gehring, P. Apel, T. Brüning, H. M. Koch. 2014. Entering markets and bodies: increasing levels of the novel plasticizer Hexamoll® DINCH® in 24 h urine samples from the German Environmental Specimen Bank. *Int J Hyg Environ Health.* 217, 421-426.
40. Schütze, M. Lorber, K. Gawrych, M. Kolossa-Gehring, P. Apel, T. Brüning, H. M. Koch. 2015. Development of a multi-compartment pharmacokinetic model to characterize the exposure to Hexamoll® DINCH®. *Chemosphere.* 128, 216-224.
41. Y. Takahashi , T. Shibata , Y. Sasaki , H. Fujii , Y. Bito , S. Suehiro. 2008. Di(2-ethylhexyl) phthalate exposure during cardiopulmonary by pass. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 16, 4-6.
42. E. D. Van Vliet, E. D. Reitano, J. S. Chhabra, G. P. Bergen, R. M. Whyatt. 2001. A review of alternatives to di (2-ethylhexyl) phthalate-containing medical devices in the neonatal intensive care unit. *J. Perinatol.* 31, 551–560.
43. W. Wang, Z. R. Craig, M. S. Basavarajappa, R. K. Gupta, J. A. Flaws. 2012. Di (2-ethylhexyl) phthalate inhibits growth of mouse ovarian antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 258, 288-295.
44. U. Wirnitzer, U. Rickenbacher, A. Katerkamp, A. Schachtrupp. 2011. Systemic toxicity of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHT) in rodents following four weeks of intravenous exposure. *Toxicol Lett.* 205, 1, 8-14.

## ETUDE 2. SYNTHÈSE ET ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE CYTOTOXICITÉ *IN VITRO* DES MÉTABOLITES SECONDAIRES DU DEHP, DINP ET DINCH UTILISÉS DANS LA COMPOSITION DES DISPOSITIFS MÉDICAUX EN PVC PLASTIFIÉ

### Contexte de l'étude

Depuis plusieurs décennies, de nombreuses études ont été menées sur le **DEHP**, qui ont abouti à sa classification comme cancérigène, mutagène et / ou toxique pour la reproduction (CMR1B) en raison de ses effets toxiques sur la reproduction et la fertilité. Son utilisation est maintenant hautement contrôlée dans les dispositifs médicaux (DM). Le règlement Européen 2017/745 l'interdit à un taux de 0,1% en fraction de masse dans chaque DM (règlement (UE) 2017/745). Deux plastifiants alternatifs (phtalate de diisononyle (**DINP**) et acide 1,2-cyclohexane dicarboxylique (**DINCH**)) ont été envisagés par les industriels comme substituts du **DEHP** dans de nombreux produits en PVC, tels que les DM [4] en raison de leurs propriétés physicochimiques suggérant une migration plus faible et un profil toxicologique plus favorable [65] que le **DEHP**.

Le **DINP** et le **DINCH** constituent respectivement un mélange commercial complexe composé principalement d'isomères de phtalate ou de cyclohexanoate de dialcyle avec deux chaînes lipophiles de 9 carbones. Le **DINCH** (Hexamoll®) est synthétisé par hydrogénation catalytique du cycle aromatique du phtalate de diisononyle (Palatinol® N) en un cycle de type cyclohexane existant principalement dans la configuration chaise la plus stable, permettant une configuration cis- et trans. Les produits commerciaux typiques sont constitués à 90% d'isomères cis et 10% d'isomères trans. Ces deux plastifiants sont composés d'un mélange d'isomères dont l'isomère 4-méthyle constitue la fraction majoritaire à hauteur de 45% [126]. Tout comme le **DEHP**, ils ne sont pas liés de manière covalente à la matrice du PVC auquel ils sont mélangés et sont également capables de migrer tout au long de leur cycle de vie [27]. Parce qu'ils sont un mélange d'isomères, leurs métabolites sont également des mélanges d'isomères [74] de type monesters (**MINP** ou **MINCH**) et suite aux processus oxydatifs en plusieurs métabolites, notamment les mono-hydroxy, mono-oxo et mono-carboxymétabolite.

Tableau 22. Métabolites primaires et secondaires des plastifiants DINCH et DINP.

Plastifiant	Métabolites primaires	Métabolites secondaires
DINCH	MINCH MMeOCH	7-oxo-MMeOCH 7-OH-MMeOCH 7-cx-MMeOCH
DINP	MINP MMeOP	7-oxo-MMeOP 7-OH-MMeOP 7-cx-MMeOP

Certaines études de biosurveillance effectuées chez l'homme ont permis de démontrer la présence de métabolites du **DINCH** et du **DINP** dans des milieux biologiques tels que l'urine, le sang et les ongles [72,73,126,192,193]. Cependant, malgré les données toxicologiques chez les animaux et la toxicité *in vitro* des plastifiants, il n'existe pratiquement aucune information sur la toxicité *in vitro* des métabolites oxydés du **DINP** et du **DINCH** provenant des DM, à l'exception des métabolites urinaires du **DINCH**, qui semblent présenter un impact sur les activités des récepteurs nucléaires humains ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . Toutefois, les données *in vitro* ne permettent pas de conclure avec certitude que le **DINCH** ou l'un des métabolites étudiés puisse exercer des effets endocriniens *in vivo* au niveau de l'exposition humaine [25,26].

Dans la continuité de nos travaux sur les plastifiants alternatifs au **DEHP**, nous avons donc entrepris la synthèse totale des métabolites secondaires du **DINP** et du **DINCH** afin de pouvoir réaliser une première étude de cytotoxicité sur la lignée fibroblastique L929 conformément à la norme EN ISO 10- 993-5 de la Commission Européenne.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication : Eljezi Teuta et al. **In vitro cytotoxic effects of secondary metabolites of DEHP and its alternative plasticizers DINCH and DINP on a L929 cell line.** (2019) *Int. J. Hyg. Environ. Health* 222, 3, 583-589 (doi: 10.1016/j.ijheh.2019.03.005).

Remarque : Ces métabolites primaires et secondaires ont également permis d'étalonner les outils analytiques permettant de les quantifier dans les urines des patients recueillies lors de l'étude clinique non interventionnelle approuvée par le Comité de Protection des Personnes CPP Sud-Est VI, AU 1082. Cette méthode analytique a fait l'objet d'une publication dont nous sommes co-auteur : Pinguet J et al. **New SPE-LC-MS/MS method for the simultaneous determination in urine of 22 metabolites of DEHP and alternative plasticizers from PVC medical devices.** (2019) *Talanta* 198, 377-389 (doi: 10.1016/j.talanta.2019.01.115).

# **IN VITRO CYTOTOXIC EFFECTS OF SECONDARY METABOLITES OF DEHP AND ITS ALTERNATIVE PLASTICIZERS DINCH AND DINP ON A L929 CELL LINE**

**Teuta Eljezi,<sup>a,b,1</sup> Pierre Pinta,<sup>c,1</sup> Fabien Nativel<sup>c</sup> Damien Richard,<sup>d</sup> Jérémy Pinguet,<sup>d</sup> Olivier Roy,<sup>e</sup> Valérie Sautou,<sup>b</sup> Gaël Grimandi,<sup>c</sup> Emmanuel Moreau,<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> Université Clermont- Auvergne, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, BP 184, F-63005 Clermont-Ferrand, France. Inserm, U 1240, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Centre Jean Perrin, F-63011 Clermont-Ferrand, France.

<sup>b</sup> Université Clermont Auvergne, CHU Clermont Ferrand, CNRS, SIGMA Clermont, ICCF, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>c</sup> Inserm, UMR 1229, Regenerative Medicine and Skeleton (RMes), Université de Nantes, ONIRIS, 44042 Nantes, France

<sup>d</sup> Service de Pharmacologie, CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

<sup>e</sup> Université Clermont Auvergne , CNRS, SIGMA Clermont, ICCF, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

\* corresponding author: emmanuel.moreau@uca.fr

<sup>1</sup> both authors contributed equally

## **ABSTRACT**

*Background:* Phthalic acid esters are widely used to improve the plasticity of PVC in medical devices (MD). The most famous plasticizer is **DEHP**, whose use in medical devices has been contested by the European authorities since 2008. Several alternative plasticizers are being considered to replace **DEHP**, such as **DEHT**, **TOTM**, **DINP** or **DINCH**, but they are also released from the PVC throughout their life cycle and are metabolized in the same way as **DEHP**.

*Objectives:* Our study focuses on the *in vitro* cytotoxicity of two alternative plasticizers (**DINCH** and **DINP**) contained in certain medical devices. They are likely to migrate and be transformed *in vivo* into the primary and secondary metabolites by a metabolism similar to that of **DEHP**. This preliminary study is the first to assess the *in vitro* cytotoxicity of oxidized metabolites of DINCH and DINP based on the EN ISO 10-993-5 standards documents.

*Methods:* We have studied the complete multi-step organic synthesis of secondary metabolites of **DINP** and **DINCH** and have performed cytotoxicity tests on L929 murine cells according to the ISO-EN ISO 10993-5 standard design for the biocompatibility of a MD. The tested concentrations of obtained metabolites (0.01, 0.05 and 0.1 mg/mL) covered the range likely to be found for DEHP (total metabolism) in biological fluids coming into direct contact with the MD. The concentrations tested in our study were chosen based on a complete

transformation of the plasticizers released after direct contact between a MD and the patient's blood.

### *Results*

Only **7-oxo-MMeOCH** is cytotoxic at the highest concentration (0.1 mg/mL) after 7 days of exposure, just like **5-oxo-MEHP** for the same concentration. By contrast, **7-OH-MMeOP**, **7-cx-MMeOP**, **7-oxo-MMeOP**, **7-OH-MMeOCH** and **7-cx-MMeOCH** were not found to be cytotoxic.

*Conclusion:* The known concentrations of these secondary metabolites in urinary samples are in the µg/L range, i.e. about 100-1000 times lower than the concentrations tested in this study. Cytotoxicity is known to be dose-dependent but it is not always the case for endocrine perturbations and the secondary metabolites could induce endocrine perturbations at very low doses.

### **Keywords**

DINCH, DINP, metabolite synthesis; cytotoxicity, DEHP-alternative plasticizers

### **Abbreviations**

ARMED<sup>®</sup>, Assessment and Risk Management of Medical Devices in Plasticized Polyvinylchloride; **DEHP**, diethylhexyl phthalate; **DINCH**, diisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate; **DINP**, di-isononylphthalate; **MEHP**, monoethylhexyl phthalate; **MMeOP**, mono(4-methyloctyl)phthalate; **MMeOCH**, mono(4-methyloctyl) cyclohexane-1,2-dicarboxylate; **MINCH**, monoisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate; **MINP**, monoisononylphthalate; **7-oxo-MMeOCH**, mono(4-methyl-7-oxooctyl) cyclohexane-1,2-dicarboxylate, **7-OH-MMeOCH** mono(7-hydroxy-4-methyl-octyl) cyclohexane-1,2-dicarboxylate, **7-cx-MMeOCH**, mono(7-carboxy-4-methyl-octyl) cyclohexane-1,2-dicarboxylate, **7-oxo-MMeOP**, mono(4-methyl-7-oxooctyl)phthalate, **7-OH-MMeOP** mono(7-hydroxy-4-methyloctyl)phthalate, **7-cx-MMeOP**, mono(7-carboxy-4-methyloctyl)phthalate  
**SCENIHR**, Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks.

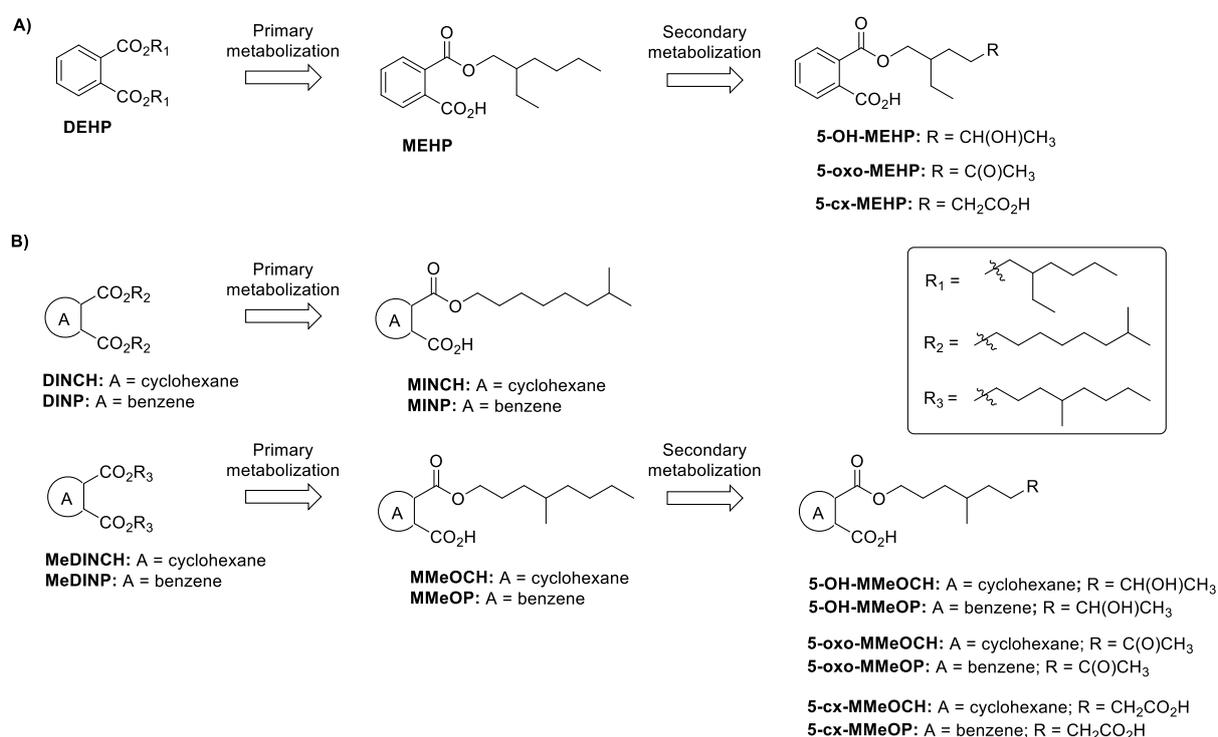
## **1. INTRODUCTION**

Some phthalate esters present a general concern for public health due to their wide use in the manufacturing of polymeric materials and various consumer products. Some phthalate esters can be classified into two categories according to the number of carbons in the ester chain. On the one hand, there are those with a low molecular weight (number of carbon inferior to 6) which are used as industrial solvents, lubricants, and as components in personal-care products. On the other hand, those with a high molecular weight are commonly used as plasticizers, conferring better flexibility and durability to everyday polyvinyl chloride (PVC) consumer products, such as flooring, food packaging, clothing, children's toys and medical

devices (Hauser and Calafat, 2005). These PVC plasticizers can be released from the polymers by volatilization into the air, abrasion of the polymer, leaching into liquids and direct diffusion from the polymer into dust on the polymer surface, resulting in subsequent human exposure which might cause adverse health effects (Giovanoulis G et al. 2018; Zhang, S. et al. 2016; Engel, A. et al., 2017, 2018). With regard to their presence in PVC medical devices, the most famous plasticizers is **DEHP**, whose use has been contested by the European authorities (SCENHIR, 2008, 2016). The toxic potential of **DEHP** is largely due to the metabolic transformation into more toxic metabolites by hydrolysis (**MEHP**) and subsequent oxidation reactions (**5-OH-MEHP**, **5-oxo-MEHP**, **5-cx-MEHP**) (**Figure 1A**). Numerous studies have been carried out on **DEHP**, leading to its classification as carcinogenic, mutagenic and/or toxic for reproduction (CMR1B) because of its toxic effects on reproduction and fertility in rodents. Its use is now highly controlled in medical devices. The European regulation 2017/745 recommends not to exceed a rate of 0.1% in mass fraction in each medical device (Regulation (EU) 2017/745). Two alternative plasticizers (diisononyl phthalate (**DINP**) and 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid (**DINCH**)) have been considered by manufacturers as a replacement for **DEHP** in many PVC products, such as medical devices and food packaging, but ~~not in toys~~ are limited in toys with concentrations inferior to 0.1% by weight of the plasticized material (European Chemical Agency, 2013; SCENHIR, 2016), due to their physicochemical properties suggesting a lower migration and more favorable toxicological profile (Fromme et al 2016, Bhat et al 2014) than **DEHP**. **DINP** and **DINCH** respectively constitute a complex commercial mixture composed mainly of isomers of phthalate or dialkyl cyclohexanoate with 9 carbon chains. **DINCH** (Hexamoll®) is manufactured by catalytic hydrogenation of the aromatic ring of diisononyl phthalate (Palatinol® N) into the cyclohexane ring existing predominantly in the most stable chair configuration, allowing cis- and trans-configuration. The typical commercial products consist of 90% cis- and 10% trans-isomers. In both molecules, the 4-methyl isomer forms a fraction that represents less than 50% of the total C9 alcohols (Schütze et al. 2017). Like **DEHP**, they are not covalently bonded to the PVC to which they are mixed. As a result, they are released from the products throughout their life cycle (Bernard et al 2015; Jeon et al. 2016). Because they are a mixture of isomers, their metabolites are also isomeric mixtures (Silva et al. 2013). Both are initially hydrolyzed in rodents and humans into their monoester (**MINP** or **MINCH**), followed by oxidative processes into several metabolites including mono-hydroxy, mono-oxo and mono-carboxymetabolites (Silva et al., 2007a, 2007b, Koch et al. 2007a, 2007b, 2013) (**Figure 1B**).

Some biomonitoring studies carried out in humans have made it possible to demonstrate the presence of **DINCH** and **DINP** metabolites in biological media such as urine, blood and nails (Gianouvoulis et al. 2016, 2018, Correia-Sa et al. 2017, Schütze et al. 2012, 2017, Zeman et al. 2013; Koch et al. 2017, Johns LE 2015). However, despite the animal toxicology data and the *in vitro* toxicity of the plasticizers, there is almost no information on the *in-vitro* toxicity of the oxidized metabolites of **DINP** and **DINCH** from medical devices except the urinary metabolites

of **DINCH**, which seem to have an impact on the activities of the human nuclear receptors ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . However, the in vitro data does not support the notion that DINCH or any of the investigated metabolites may exert considerable endocrine effects in vivo at relevant human exposure levels. (Engel et al. 2017 and 2018). In a previous study we investigated the cytotoxicity of **DEHP**, **DINCH**, **DINP** and their corresponding primary unconjugated metabolites (**MEHP**, **MINCH**, **MMeOCH**, **MINP**, respectively), and showed that the primary metabolites are more cytotoxic than their corresponding plasticizer at concentrations between 0.01 and 0.1 mg/mL. Only **MMeOP**, the primary metabolite of **DINP**, is not cytotoxic at these concentrations (Eljezi et al., 2017). Taking into account that DINP and DINCH are metabolized in the same way as DEHP, secondary metabolites are also found in the urine (7-oxo-MMeOCH, 7-OH-MMeOCH, 7-cx-MMeOCH, 7-oxo-MMeOP, 7-OH-MMeOP and 7-cx-MmeOP) in a glucuroconjugated form or not. According to the data in the literature, it appears that 26 % of cx-MINCH are excreted in its unconjugated form in urine (Koch et al., 2013). These results are similar to the previous work concerning DEHP and DINP (Silva et al., 2003). In continuation of our work on alternative plasticizers to DEHP, we therefore undertook the total synthesis of the secondary metabolites of DINP and DINCH in order to be able to carry out a first cytotoxicity study on the NCTC clone 929 in accordance with the EN ISO 10-993-5 standards documents.



**Figure 1: Primary and secondary metabolites of DEHP, DINCH, DINP, MeDINCH and MeDINP**

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Chemicals, biochemicals and reagents

Unless otherwise mentioned, all manipulations were performed under an argon atmosphere. All reagents were purchased from the following commercial suppliers: Sigma-Aldrich, Acros Organics, Carlo Erba, TCI Europa, and Alpha Aesar. Anhydrous DMF and anhydrous triethylamine were purchased from Acros Organics. THF was distilled over benzophenone and sodium. Dichloromethane was distilled over calcium hydride. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were acquired on a Bruker AC-200 or AC-400 instrument operating at 200 MHz and 50 MHz or 400 MHz and 100 MHz for <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR, respectively. All <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectral peaks are reported in  $\delta$  units, parts per million (ppm), and the coupling constants are indicated in hertz (Hz). The following abbreviations are used for spin multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, and br = broad. The chromatographic system consisted of an HTC PAL autosampler, and a Transcend TLX-1 HTLC System (ThermoFisher Scientific, San Jose, United States). The HRMS analysis was performed using a Thermo Exactive benchtop Orbitrap<sup>®</sup> instrument. TLC was performed on pre-coated silica gel sheets (POLYGRAM<sup>®</sup> 60F254 plates) and visualized under UV light (254 nm). Revelators used were KMnO<sub>4</sub> (1.5 g KMnO<sub>4</sub>, 10 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, and 1.25 mL 10% NaOH in 200 mL water) and ninhydrin (1.5 g ninhydrin in 100 mL of n-butanol with 3 mL AcOH). Column chromatography was performed using a silica gel normal phase (35–70  $\mu$ m). A HPLC Prominence-i LC-2030 CSCHIMADZU with Kinetex 5  $\mu$ m EVO C18 (Phenomenex) column with pore diameter (A) 82-102, particle size ( $\mu$ m) 4.5-4.8, and column dimensions of 50 x 4.6 mm was used to purify secondary metabolites. Uncorrected melting points (Mp) were recorded on an Electrothermal IA9300 apparatus. Infrared spectra (IR) were recorded on a Bruker FT Vector 22. The 5-oxo-MEHP, 5-OH-MEHP and 5-cx-MEHP compounds were synthesized using the procedure described by Nüti et al. (Nüti et al, 2005).

Dimethylsulfoxide DMSO (ref: D8418 CAS: 67-68-5), Mouse fibroblasts L929 (ref: 85011425 lot: 10L019), MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, ref: M2128) were also purchased from Sigma Aldrich. Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (fetal calf serum (SVF), phosphate saline buffer (PBS), penicillin (P), streptomycin (S), and actinomycin D) were purchased from Life technologies SAS, France. For more details, see supporting information (**Annex 2**).

### 2.2 Methods for the synthesis of the secondary metabolites 7-oxo-MMeOCH, 7-OH-MMeOCH, 7-cx-MMeOCH, 7-oxo-MMeOP, 7-OH-MMeOP and 7-cx-MMeOP

Metabolites **7-oxo-MMeOCH**, **7-OH-MMeOCH**, **7-cx-MMeOCH**, **7-oxo-MMeOP**, **7-OH-MMeOP** and **7-cx-MMeOP** were synthesized from the appropriate anhydrides (hexahydroisobenzofuran-1,3-dione or phthalic anhydride) and 7-(benzyloxy)-4-methylheptan-1-ol previously synthesized and characterized (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR and HRMS) by our lab (Eljezi et al.

2017). The benzyl group at  $\beta$ -position was then removed under hydrogen atmosphere and the resulting alcohol was oxidized into an aldehyde compound which was converted into vinyl compounds **6** or **18**. From the appropriate vinyl compound (**6** or **18**), **7-oxo-MMeOCH** or **7-oxo-MMeOP** could be obtained by oxidation in a mixture of PdCl<sub>2</sub> and parabenzoquinone. These were directly converted into **7-OH-MMeOCH** or **7-OH-MMeOP** by a regioselective reduction in the presence of NaBH<sub>4</sub>. Concerning **7-cx-MMeOCH** or **7-cx-MMeOP**, they were obtained from vinyl derivatives **6** or **18** by hydroboration followed by an oxidation in the presence of Jones reagent. The purity of all synthesized metabolites was over 95% (HPLC/MS). All experimental details are described in the supporting material (**Annex 2**).

### 2.3 Biocompatibility assays

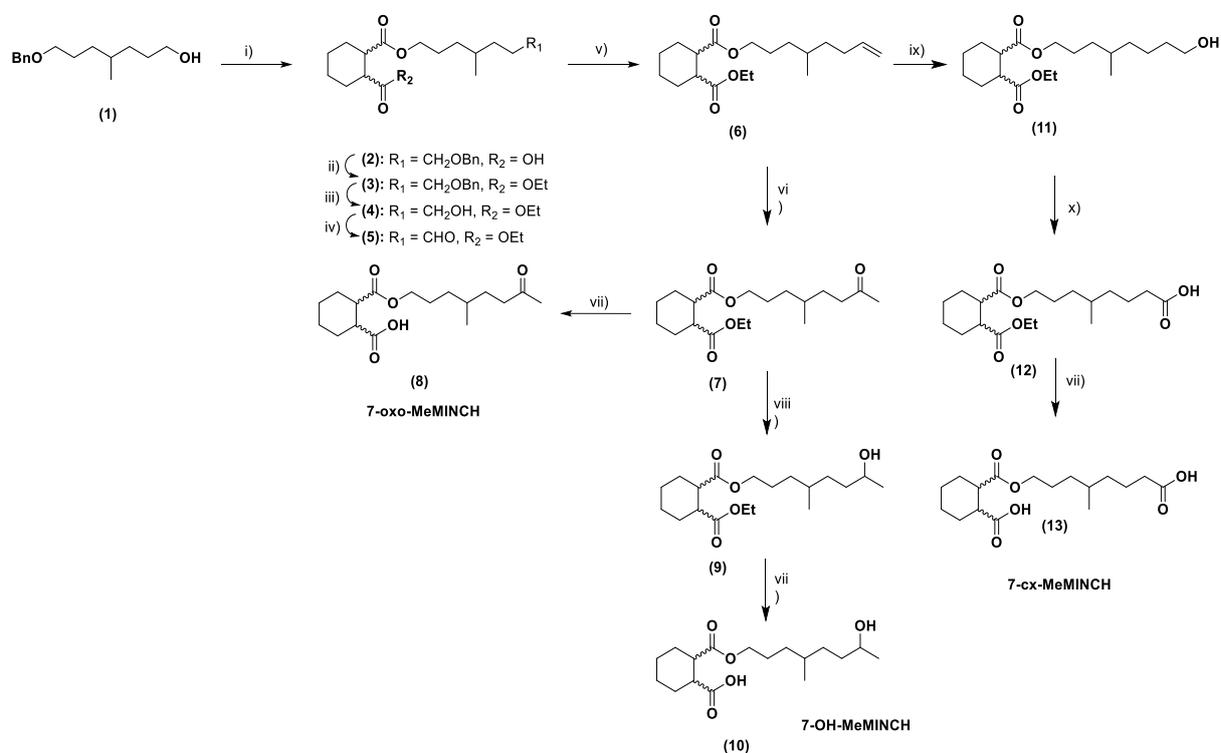
For the solubilization of the plasticizers, cell cultures, viability assays for the synthesized metabolites and statistical analysis, we used the same procedures previously described by us (Eljezi et al. 2017). For more details, see supporting information (**Annex 1**).

## 3. RESULTS

### 3.1 Synthesis of MeDINCH and MeDINP secondary metabolites

The three metabolites of the **MeDINCH** plasticizer, i.e. **7-oxo-MMeOCH**, **7-OH-MMeOCH** and **7-cx-MMeOCH**, were synthesized from monoprotected alcohol **1** (Eljezi et al.2017) and hexahydroisobenzofuran-1,3-dione (Scheme 1). Acid compound **2** was esterified, followed by a catalytic hydrogenation to produce compound **4**. The hydroxy group at  $\beta$ -position of the alkyl chain was oxidized into an aldehyde. Compound **5** reacted with isopropyltriphenylphosphonium iodide (Wittig reaction) to obtain vinyl derivative **6**. According to the procedure previously described (Nüti et al. 2005), this vinyl function produced a ketone function at position C-7 of the alkyl chain (compound **7**) which was converted into **7-oxo-MMeOCH** after a soft saponification. Compound **7** was also reduced in the presence of NaBH<sub>4</sub> followed by a treatment with lithium hydroxide monohydrate to give **7-OH-MMeOCH**. Finally, the third secondary metabolite, **7-cx-MMeOCH**, was obtained from compound **6** after a hydroboration of the vinyl function, followed by an oxidation of the primary alcohol function with Jones reagent and a soft saponification. All of these syntheses are depicted in Scheme 1.

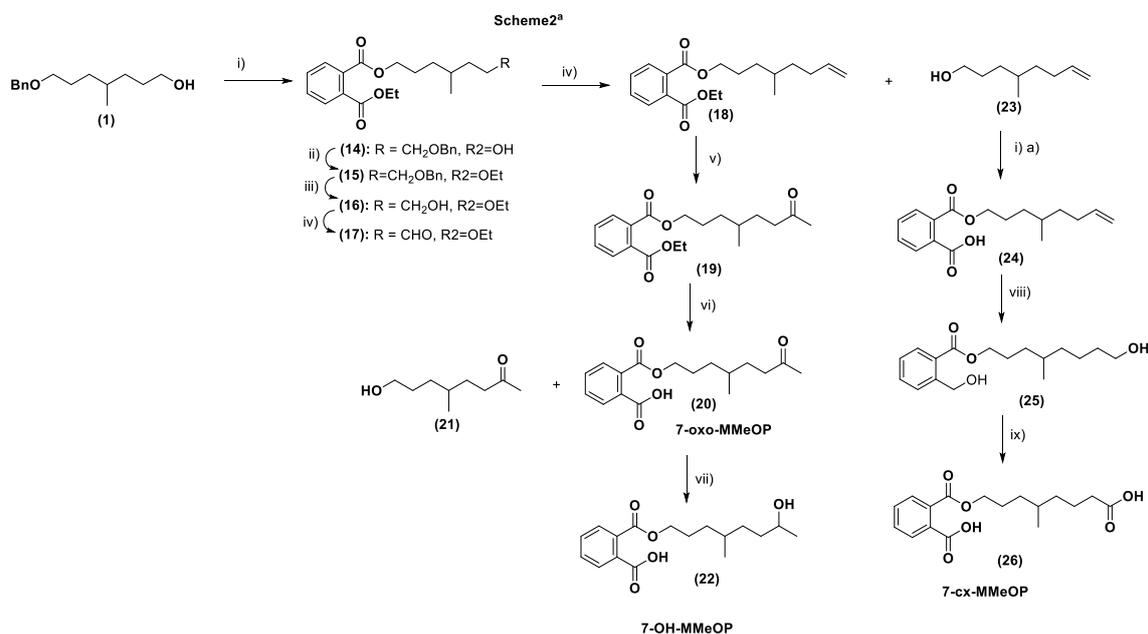
**Scheme 1. Synthesis of secondary metabolites 7-oxo-MMeOCH, 7-OH-MMeOCH and 7-cx-MMeOCH**



<sup>a</sup>**Conditions and reagents:** i) 1,2-cyclohexane dicarboxylic anhydride, pyridine, 125°C; ii) EtOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Δ; iii) H<sub>2</sub>, Pd/C (1 bar); iv) PCC, dichloromethane, rt; v) isopropyltriphenylphosphonium iodide, n-BuLi, THF, -78°C to rt; vi) PdCl<sub>2</sub>, p-benzoquinone, DMF/H<sub>2</sub>O (7/1; v/v), rt; vii) LiOH (1M), THF/methanol (3/1; v/v), rt; viii) NaBH<sub>4</sub>, ethanol, rt; ix) B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> (1M), THF, rt; x) Jones reagent, rt;

The secondary metabolites **7-oxo-MMeOP**, **7-OH-MMeOP** and **7-cx-MMeOP** were synthesized using a similar strategy developed for secondary metabolites of **MeDINCH** (Scheme 2). Briefly, vinylic precursor **18** was obtained by condensation of the monoprotected alcohol **1**, and anhydride phthalic, followed by an esterification, deprotection of the 7-hydroxy group at C-7 position, then its oxidation and a Wittig reaction. Finally, this vinyl function enabled **7-oxo-MMeOP** to be obtained in two steps (Wacker oxidation and a soft saponification), then **7-OH-MMeOP** by a reduction in presence of NaBH<sub>4</sub>. Compound **7-cx-MMeOP** was obtained after a hydroboration, followed by an oxidation with Jones reagent.

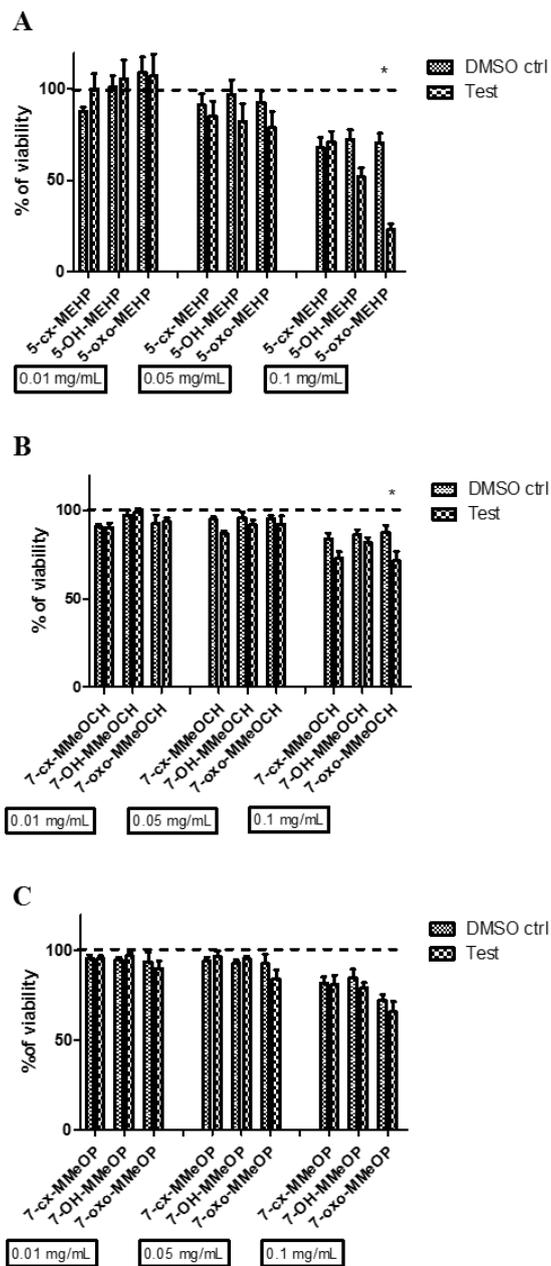
## Scheme 2. Synthesis of secondary metabolites 7-oxo-MMeOP, 7-OH-MMeOP and 7-cx-MMeOP.



<sup>a</sup>Conditions and reagents: i) a) phthalic anhydride, pyridine, 125°C; b) EtOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Δ; ii) H<sub>2</sub>, Pd/C (1 bar); iii) PCC, dichloromethane, rt; iv) isopropyltriphenylphosphonium iodide, n-BuLi, THF, -78°C to rt; v) PdCl<sub>2</sub>, p-benzoquinone, DMF/H<sub>2</sub>O (7/1; v/v), rt; vi) LiOH (1M), THF/methanol (3/1; v/v), rt; vii) NaBH<sub>4</sub>, ethanol, rt; viii) B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> (1M), THF, rt; ix) Jones reagent, rt;

### 3.2 Viability of cells when exposed to the secondary metabolites of plasticizers

Figure 2 shows the results of viability tests, at day 7 (D7), performed on L929 cells cultured in the presence of the three concentrations of plasticizers after 7 days of contact. Compounds **5-cx-MEHP**, **5-OH-MEHP**, **7-cx-MMeOCH**, **7-OH-MMeOCH**, **7-cx-MMeOP**, **7-OH-MMeOP**, **7-oxo-MMeOP** were not toxic to the cells at concentrations of 0.01, 0.05, and 0.1 mg/mL compared with the control containing DMSO at the same concentrations. A decrease in cell viability was observed for **5-oxo-MEHP** and **7-oxo-MMeOCH** from the concentration of 0.1 mg/mL. A significant decrease in viability of over 50% was observed for **5-oxo-MEHP**.



**Figure 2: Cytotoxicity tests of secondary metabolites at 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL and 0.1 mg/mL, on day 7. Outcomes of the cell viability analysis using a MTT assay. L929 cells were seeded at  $10^4$  cells/well and cultured for 7 days in three conditions: control (complete medium), control DMSO (complete medium supplemented with 0.1%, 0.5% and 1% DMSO) and test (working solutions of the plasticizer in complete medium at 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL and 0.1 mg/mL). MTT assays and quantification of the viability percentage were carried out every day. \* $p < 0.05$  DMSO control vs Test.**

#### 4. DISCUSSION

For several years, our research program has focused on **DEHP** and some of the corresponding alternatives in medical devices. **DINCH** and **DINP** are two plasticizers commonly used as alternatives to **DEHP** in PVC medical devices. **DINCH** is used in parenteral and enteral nutrition tubings as well as in hemodialysis lines (Strommen et al. 2016). **DINP** is added to some PVC infusions tubings or blood transfusion sets (Fredericks et al. 2014; Bernard et al. 2015; Bourdeaux et al. 2016). Like **DEHP**, these plasticizers are also known to migrate from medical devices and to enter into contact with the patient's body where they are metabolized into primary and secondary forms (Bernard et al. 2015). Based on data obtained from ICU studies carried out in recent years (Frederiksen et al. 2014; Huygh et al. 2015; Strommen et al. 2016), it seems that these metabolites are less present in the urine than those of **DEHP**. Although these metabolites are mainly eliminated in their conjugated form in the urine, about 26% of the acid form is in its free form (5cx-MINCH) (Koch et al., 2013). Similar data have been published for **DEHP** and **DINP** (Silva et al., 2003). The cytotoxicity of their respective primary metabolites (**MINCH**, **MeMINCH**, **MINP** and **MeMINP**) has also been evaluated (Eljezi et al. 2017) but the cytotoxicity of the secondary metabolites of **DINCH** and **DINP** have not currently been studied. We thus synthesized these secondary metabolites (**7-oxo-MMeOCH**, **7-OH-MMeOCH**, **7-cx-MMeOCH**, **7-oxo-MMeOP**, **7-OH-MMeOP** and **7-cx-MMeOP**) in sufficient quantities to complete preliminary cytotoxicity test. Based on the urinary concentrations found for these secondary metabolites (conjugates or not), the concentrations of the secondary metabolites of **DEHP** are much higher than those of **DINP** and **DINCH** (0.3-5 µg/mL for **DEHP** versus 0.008-0.1 µg/mL for **DINP** and **DINCH**) (Frederiksen et al., 2014; Huygh et al., 2015; Strommen et al., 2016). We therefore evaluated the cytotoxicity of the secondary metabolites of **DINP** and **DINCH** over a larger concentration range (0.01-1 mg/mL), which is a very pessimistic scenario, and compared these results with those obtained for the secondary metabolites of **DEHP**. We chose this concentration range in order to take into account the fact that **DINCH** and **DINP** could be increasingly used in the composition of medical devices, thus exposure to them is expected to increase in the coming years. It must also be taken into consideration that patients in intensive care units are exposed to several medical devices that may contain these alternative plasticizers (Huygh et al. 2015; Strommen et al. 2016). Metabolites **7-OH-MMeOP**, **7-OH-MMeOCH**, **7-cx-MMeOP**, **7-cx-MMeOCH** do not cause any cytotoxicity up to concentrations of 0.1 mg/mL, just like the corresponding secondary metabolites of **DEHP**, i.e. **7-OH-MEHP** and **5-cx-MEHP**. This is also true for **7-oxo-MMeOP**, the third secondary metabolite of **DINP**. However, **7-oxo-MMeOCH**, like **5-oxo-MEHP**, has been shown to be cytotoxic at 0.1 mg/mL. No cytotoxicity was observed at a concentration below 0.05 mg/mL. The concentrations tested in our study were chosen on the basis of a complete transformation of the plasticizers released after direct contact between a MD and the patient's blood (SCENHIR 2015, Eckert E et al., 2015, 2016). However, the secondary metabolites, derived from the hepatic metabolism of the primary metabolite of the plasticizer

(itself derived from an enzymatic hydrolysis of the plasticizer) are present at much lower concentrations in body fluids. Human biomonitoring studies (Schütze et al. 2014, Koch et al. 2007a, 2007b) performed after the introduction of **DINCH** and **DINP** on to the market show that the concentrations of their secondary metabolites in urinary samples are in the µg/L range (example 0.71 µg/L for **7-OH-MMeOCH**, 0.33 µg/L for **7-oxo-MMeOCH**, 0.61 µg/L for **7-cx-MMeOCH**, 14.9 µg/L for **7-OH-MMeOP**, 8.9 µg/L for **7-oxo-MMeOP** and 16.4 µg/L for **7-cx-MMeOP**), which is about 100-1000 times lower than the concentrations tested. The **DEHP** secondary metabolites found in the urine of humans exposed for two decades are also in the order of µg/L (21.0 µg/L for **5-OH-MEHP**, 16.7 µg/L for **5-oxo-MEHP**, 26,9 µg/L for **5-cx-MEHP**) (Wittassek et al. 2007). Therefore, we can consider that these secondary metabolites of **DINCH** and **DINP** do not present a risk of cytotoxicity at the doses found in the body. This information, combined with the toxicity data obtained in animals, is reassuring with regard to the use of MDs plasticized with **DINCH** or **DINP** for situations where there is no direct contact with the patient's biological fluids (infusers, extension lines, nutrition tubings). In the case of a direct contact between the plasticized PVC in medical device and the patient's blood (extracorporeal circulation in cardiac surgery, dialysis), the risk could be different. In our previous study, we showed the cytotoxicity of primary metabolites of **DINP** and **DINCH** at 0.05 mg/mL (Eljezi et al. 2017). During an extracorporeal circulation, the plasticizer released from the MD (extracorporeal circulation line) is hydrolyzed into its glucuroconjugated primary metabolite. However, studies on plasticized **DINCH** blood bags have shown that this does not affect plasma quality and the amount of **DINCH** released is less pronounced than that of **DEHP** (Lagerberg et al. 2015). These results seem to be in agreement with those obtained in rats after i.v. injection or infusion of **DINCH** for which no apparent systemic effect had been observed up to 300 mg/kg bw/day (David et al. 2015).

It should be noted that these preliminary results attempt to show that the secondary metabolites of **DINCH** and **DINP** do not exhibit cytotoxicity according to EN ISO 10-993-5 standards documents. We will consider these different aspects when our biomonitoring study on alternative plasticizers and their corresponding metabolites are complete within the framework of **ARMED®** and **ARMED-NEO** projects. We will then select the different compounds for complementary studies.

### **Declaration of interest**

This study is a part of the **ARMED®** project and received financial support from the French National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (**ANSM**).

## REFERENCES

1. Bhat, V. S., Durham, J. L., Ball, G. L., English, J. C. 2014. Derivation of an oral reference dose (RfD) for the nonphthalate alternative plasticizer 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid, di-isononyl ester (DINCH). *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 17, 2, 63-94.
2. Bernard, L., Cueff, R., Chagnon, M., Abdoulouhab, F., Décaudin, B., Breyse, C., Kauffmann, S., Cosserant, B., Souweine, B., Sautou, V. 2015. Migration of plasticizers from PVC medical devices: Development of an infusion model. *Int. J. Pharm.* 494, 1, 136-145.
3. Bourdeaux, D., Yessaad, M., Chennell, P., Larbre, V., Eljezi, T., Bernard, L., Sautou, V. 2016. Analysis of PVC plasticizers in medical devices and infused solutions by GC-MS. *J. Pharm. Biomed Anal.* 118, 206-213.
4. Campioli E, Lee S, Lau M, Marques L, Papadopoulos V. 2017. Effect of prenatal DINCH plasticizer exposure on rat offspring testicular function and metabolism. *Sci. Rep.* 7, 1, 11072.
5. Correia-Sá, L., Schütze, A., Norberto, S., Calhau, C., Domingues, V. F., Koch, H. M. Exposure of Portuguese children to the novel non-phthalate plasticizer di-(iso-nonyl)-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH). 2017. *Environ. Int.* 102, 79-86.
6. David, R. M., White, R. D., Larson, M. J., Herman, J. K., Otter, R. 2015. Toxicity of Hexamoll(®) DINCH(®) following intravenous administration. *Toxicol Lett.* 238, 2, 100-109.
7. Eckert, E., Müller, J., Göen, T. 2015. Simultaneous determination of polyvinylchloride plasticizers di(2-ethylhexyl) phthalate and tri(2-ethylhexyl) trimellitate and its degradation products in blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1410, 173-180.
8. Eckert E, Münch F, Göen T, Purbojo A, Müller J, Cesnjevar R. 2016. Comparative study on the migration of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and tri-2-ethylhexyl trimellitate (TOTM) into blood from PVC tubing material of a heart-lung machine. *Chemosphere* 145, 10-16.
9. Eljezi, T., Pinta, P., Richard, D., Pinguet, J., Chezal, J. M., Chagnon, M. C., Sautou, V., Grimandi, G., Moreau, E. 2017. In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line. *Chemosphere* 173, 452-459.
10. Engel, A., Buhrke, T., Imber, F., Jessel, S., Seidel, A., Völkel, W., Lampen, A. 2017. Agonistic and antagonistic effects of phthalates and their urinary metabolites on the steroid hormone receptors ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and AR. *Toxicol. Lett.* 277, 54-63.
11. Engel, A., Buhrke, T., Kasper, S., Behr, A. C., Braeuning, A., Jessel, S., Seidel, A., Völkel, W., Lampen, A. 2018. The urinary metabolites of DINCH<sup>®</sup> have an impact on the activities of the human nuclear receptors ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . *Toxicol. Lett.*, 287, 83-91.
12. ECHA. 2013. Evaluation of new scientific evidence concerning DINP and DIDP in relation to entry 52 of Annex XVII to REACH Regulation (EC) No 1907/2006. <https://echa.europa.eu/documents/10162/31b4067e-de40-4044-93e8-9c9ff1960715>. Please note: DINP is restricted according Annex XVII of Regulation (EC) No 1907/2006 and can therefore not be used for toys which can be put into the

mouth by children. <https://echa.europa.eu/documents/10162/57096439-2ddd-4f14-b832-85181a09f595>

13. Frederiksen, H., Kuiru-Hänninen, T., Main, K. M., Dunkel, L., Sankilampi, U. 2014. A longitudinal study of urinary phthalate excretion in 58 full-term and 67 preterm infants from birth through 14 months. *Environ Health Perspect.* 122, 9,998-1005.
14. Fromme, H., Schütze, A., Lahrz, T., Kraft, M., Fembacher, L., Siewering, S., Burkardt, R., Dietrich, S., Koch, H. M., Völkel, W. 2016. Non-phthalate plasticizers in German daycare centers and human biomonitoring of DINCH metabolites in children attending the centers (LUPE 3). *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 219, 1, 33-39.
15. Giovanoulis, G., Alves, A., Papadopoulou, E., Cousins, A. P., Schütze, A., Koch, H. M., Haug, L. S., Covaci, A., Magnér, J., Voorspoels, S. 2016. evaluation of exposure to phthalate esters and DINCH in urine and nails from a Norwegian study population. *Environ. Res.* 151, 80-90.
16. Giovanoulis, G., Bui, T., Xu, F., Papadopoulou, E., Padilla-Sanchez, J. A., Covaci, A., Haug, L. S., Cousins, A. P., Magnér, J., Cousins, I. T., de Wit, C. A. 2018. Multi-pathway human exposure assessment of phthalate esters and DINCH. *Environ. Int.* 112, 115-126.
17. Hauser, R., Calafat, A. M. 2005. Phthalates and human health. *Occup. Environ. Med.* 62, 11, 806-818.
18. Huang, L. P., Lee, C. C., Fan, J. P., Kuo, P.H., Shih, T.S., Hsu, P.C. 2014. Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate relation to sperm motility, reactive oxygen species generation, and apoptosis in polyvinyl chloride workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 87, 6, 635-646.
19. Huygh, J., Clotman, K., Malarvannan, G., Covaci, A., Schepens, T., Verbrugghe, W., Dirinck, E., Van Gaal, L., Jorens, P. G. 2015. Considerable exposure to the endocrine disrupting chemicals phthalates and bisphenol-A in intensive care unit (ICU) patients. *Environ Int.* 81, 64-72.
20. Jeon, S., Kim, K. T., Choi, K. Migration of DEHP and DINP into dust from PVC flooring products at different surface temperature. *Sci. Total Environ.* 15, 547, 441-446.
21. Johns LE, Cooper GS, Galizia A, Meeker JD. 2015. Exposure assessment issues in epidemiology studies of phthalates. *Environ. Int.* 85, 27-39.
22. Kleeff, J., Kornmann, M., Sawhney, H., Korc, M. 2000. Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. *Int. J. Cancer.* 86, 3,399-407.
23. Koch, H. M., Müller, J., Angerer, J. 2007a. Determination of secondary, oxidised di-iso-nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine representative for the exposure to commercial DINP plasticizers. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed Life Sci.* 847, 2, 114-125.
24. Koch, H. M., Angerer, J. 2007b. Di-iso-nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine after a single oral dose of deuterium-labelled DINP. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 210, 1, 9-19.
25. Koch, H. M., Schütze, A., Pälme, C., Angerer, J., Brüning, T. 2013. Metabolism of the plasticizer and phthalate substitute diisononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH<sup>®</sup>) in humans after single oral doses. *Arch. Toxicol.* 87, 5, 799-806.
26. Koch HM, Rüter M, Schütze A, Conrad A, Pälme C, Apel P, Brüning T, Kolossa-Gehring M. Phthalate metabolites in 24-h urine samples of the German

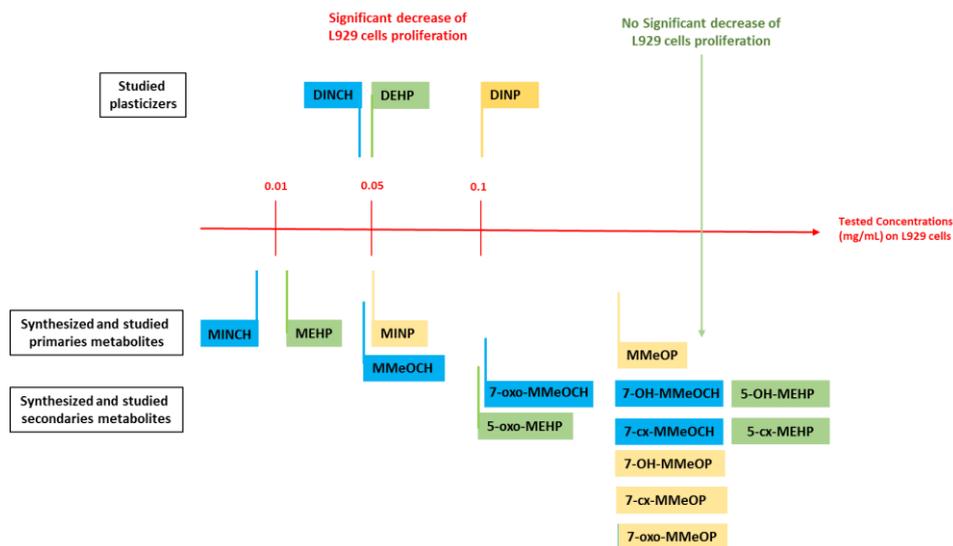
- Environmental Specimen Bank (ESB) from 1988 to 2015 and a comparison with US NHANES data from 1999 to 2012. 2017. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 220(2 Pt A),130-141.
27. Lagerberg, J. W., Gouwerok, E., Vlaar, R., Go M., de Korte D. 2015. In vitro evaluation of the quality of blood products collected and stored in systems completely free of di(2-ethylhexyl)phthalate-plasticized materials. *Transfusion.* 55, 3, 522-531.
  28. Nuti, F., Hildenbrand, S., Chelli, M., Wodarz, R., Papini, A. M. 2005. Synthesis of DEHP metabolites as biomarkers for GC–MS evaluation of phthalates as endocrine disrupters. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 10, 3461-3465.
  29. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European parliament and of the council. 2008. Official Journal of the European Union.
  30. Regulation (EU) 2017/745 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on medical devices. Official Journal of the European Union.
  31. SCENIHR, (Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks) opinion on the safety of medical devices containing dehp- plasticized pvc or other plasticizers on Neonates and other groups possibly at risk (February 2008). [https://ec.europa.eu/health/archive/ph\\_risk/committees/04\\_scenihhr/docs/scenihhr\\_o\\_014.pdf](https://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_014.pdf)
  32. SCENIHR, (Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks) opinion on the safety of medical devices containing dehp- plasticized pvc or other plasticizers on Neonates and other groups possibly at risk (February 2016 update). [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific\\_committees/emerging/docs/scenihhr\\_o\\_047.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/emerging/docs/scenihhr_o_047.pdf)
  33. Schütze, A., Pälme, C., Angerer, J., Weiss, T., Brüning, T., Koch, H. M. 2012. Quantification of biomarkers of environmental exposure to di(isononyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) in urine via HPLC–MS/MS. *J. Chromatogr. B.* , 895-896, 123-130.
  34. Schütze, A., Kolossa-Gehring, M., Apel, P., Brüning, T., Koch, H. M. 2014. Entering markets and bodies: increasing levels of the novel plasticizer Hexamoll® DINCH® in 24 h urine samples from the German Environmental Specimen Bank. *Int J Hyg Environ Health.* 217, 2–3, 421-426.
  35. Schütze, A., Otter, R., Modick, H., Langsch, A., Brüning, T., Koch, H. M. 2017. Additional oxidized and alkyl chain breakdown metabolites of the plasticizer DINCH in urine after oral dosage to human volunteers. *Arch. Toxicol.* 91, 1, 179-188.
  36. Silva, M. J., Samandar, E., Preau, J. L. Jr, Reidy, J. A., Needham, L. L., Calafat, A. M. 2007a. Quantification of 22 phthalate metabolites in human urine. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 860, 1, 106-112.
  37. Silva, M. J., Reidy, J. A., Kato, K., Preau, J. L. Jr, Needham, L. L., Calafat, A. M. 2007b. Assessment of human exposure to di-isodecyl phthalate using oxidative metabolites as biomarkers. *Biomarkers.* 12, 2, 133-144.
  38. Silva, M.J., Jia, T., Samandar, E., Preau Jr, J. L., Calafat, A. M. 2013. Environmental exposure to the plasticizer 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid, diisononyl ester (DINCH) in U.S. adults (2000–2012). *Environ. Res.*, 126, 159-163.
  39. Strømme, K., Lyche, J. L., Blakstad, E. W., Moltu, S. J., Veierød, M. B., Almaas, A. N., Sakhi, A. K., Thomsen, C., Nakstad, B., Brække, K., Rønnestad, A. E., Drevon, C. A.,

- Iversen, P. O. 2016. Increased levels of phthalates in very low birth weight infants with septicemia and bronchopulmonary dysplasia. *Environ Int.* 89-90, 228-234.
40. Wittassek, M., Wiesmüller, G. A., Koch, H. M., Eckard, R., Dobler, L., Müller, J., Angerer, J., Schlüter, C. 2007. Internal phthalate exposure over the last two decades-- a retrospective human biomonitoring study. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 210, 3-4, 319-333.
41. Ye, H., Ha, M., Yang, M., Yue, P., Xie, Z., Liu, C. 2017. Di2-ethylhexyl phthalate disrupts thyroid hormone homeostasis through activating the Ras/Akt/TRHr pathway and inducing hepatic enzymes. *Sci. Rep.* 7, 40153.
42. Zeman, F. A., Boudet, C., Tack, K., Floch-Barneaud, A., Brochot, C., Péry, A. R., Oleko, A., Vandentorren, S. 2013. Exposure assessment of phthalates in French pregnant women: results of the ELFE pilot study. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 216, 3, 271-279.
43. Zhang, S., Ma J., Fu, Z., Zhang, Z., Cao, J., Huang, L., Li, W., Xu, P., Cao, X. 2016. Promotion of breast cancer cells MDA-MB-231 invasion by di(2-ethylhexyl)phthalate through matrix metalloproteinase-2/-9 overexpression. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 10, 9742-9749.

## Highlights

- **7-oxo-MMeOCH** and **5-oxo-MEHP** induced no action on cell proliferation at 0.1 mg/mL
- Among secondary metabolites of **DEHP**, **5-oxo-MEHP** induced an action on L929
- Among secondary metabolites of **MMeOCH**, **7-oxo-MMeOCH** induced an action on L929
- Secondary metabolites of **MMeOCH** are less toxic than **MMeOCH**
- Secondary metabolites of **MMeOP** are not toxic like **MMeOCH**

## Graphical abstract



## ETUDE 3. EXPOSITION DES PATIENTS AUX PLASTIFIANTS EN CHIRURGIE CARDIOVASCULAIRE VIA LES DM

### Contexte scientifique de l'étude

Les dispositifs médicaux (DM) en PVC contiennent des plastifiants, additifs ajoutés au PVC pour le rendre flexible et élastique. Ces plastifiants n'étant pas liés de manière covalente à la matrice de PVC, ils sont susceptibles de migrer au contact des médicaments perfusés, du sang ou autres fluides biologiques. Il existe d'ores et déjà des études menées *ex vivo* [8–13,27,79–82,86] concernant la migration de ces plastifiants à partir des DM. Les plastifiants ainsi relargués entrent en contact avec les patients lors de procédures médicales utilisant ces DM (perfusion, circulation extracorporelle, nutrition entérale ou parentérale,...). Pour évaluer l'exposition des patients aux plastifiants provenant des DM, l'apport journalier AJ (en anglais DI; Daily Intake) ou la dose d'exposition (quantité de plastifiant reçu par jour ramenée au poids du patient, exprimée en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids corporel/j), est calculé [95]. Cette valeur peut être déterminée à partir des quantités de plastifiants mesurées dans les échantillons urinaires (exposition interne) pour une période donnée tenant compte toutes les voies d'exposition [83,95]. Elle peut également être estimée à partir de modèles expérimentaux *ex vivo* par mise en contact de DM avec différents simulants dans des conditions représentatives de la réalité clinique et mesure des quantités de plastifiants relargués) [9,10,12,20,80,86,88]. Des modèles mathématiques basés sur la loi de Fick peuvent être développés et sont souvent adaptés à partir des données obtenues lors des expériences *ex vivo*.

Afin d'estimer le risque lié à l'exposition des patients aux différents plastifiants, les doses d'exposition AJ sont comparées aux valeurs toxicologiques de référence, DJT (doses journalières tolérables ou TDI de l'anglais Total Daily Intake) qui sont définies pour chaque plastifiant. La DJT est la quantité d'une substance qu'un individu peut théoriquement ingérer quotidiennement sans risque pour la santé. Les valeurs des DJT des plastifiants étudiés sont présentées dans le Tableau 1 [96,97,99–102,194].

**Tableau 23. Les valeurs des doses journalières tolérables DJT (TDI en anglais) par voie orale du DEHP et des plastifiants alternatifs.**

	DEHP	DINP	DINCH	DEHT	DEHA	TOTM	ATBC
<b>DJT (TDI) µg / kg / j</b>	50	150	400	3950	300	1130	1000
<b>Références</b>	EFSA 2005a	EFSA 2005b	NICNAS 2011	ECHA 2014b Danich EPA 2014	Stuer- Lauridsen et al. 2001	ECHA 2014b Danich EPA 2014	NICNAS 2011 Danich EPA 2014

Les DJT (TDI) des plastifiants sont des valeurs établies à partir des données toxicologiques animales. Elles sont calculées à partir de la NOAEL, dose sans effet toxique observable. [45]. Entre NOAEL et DJT, il existe une marge de sécurité de l'ordre de 100. Dans le cas où le risque est très élevé, la marge peut être inférieure.

**Tableau 24. Valeurs NOAEL (mg / kg / j) par voie orale des plastifiants issues des études de toxicité animale [4].**

Plastifiant	NOAEL (mg / kg / j) selon les études de toxicité animale			
	Toxicité par dose répétée ou toxicité	Génotoxicité	Cancérogénicité	Toxicité sur la reproduction / le développement / effets perturbateur endocriniens
<b>DEHP</b>	29 / 36 male/ femelle	ND	98	4,8
<b>DINP</b>	15	ND	112	50
<b>DINCH</b>	107,1 / 389,4 318 / 342 male/ femelle	ND	40 / 200 male/ femelle	1,000
<b>DEHT</b>	584 / 617 1000 / 1100 male/ femelle	ND	79 / 102 male / femelle	458 / 747
<b>DEHA</b>	40, 200 et 1000	ND	ND	200
<b>TOTM</b>	100 / 1000 male/ femelle	ND	ND	100 / 1000 male/ femelle

ND : Non déterminé.

Donc, si la dose d'exposition AJ d'un plastifiant est au-dessus de la DJT, le patient est potentiellement exposé à un risque toxique qui varie plus ou moins en fonction du composé. Actuellement il n'y a pas d'études permettant d'évaluer l'exposition aux plastifiants issus des

DM lors d'une prise en charge médicale. Quelques études *ex vivo* (une seule de Kambia et al. 2001 est *in vivo*) [83] ont montré le relargage de plastifiants à partir de DM isolés en calculant la dose d'exposition AJ [8,80,83,88,110,112–117,120–122]. Cependant, en milieu hospitalier il y a utilisation de plusieurs DM pendant l'hospitalisation du patient. Par exemple, en Chirurgie Cardiovasculaire, plusieurs actes médicaux nécessitent l'utilisation simultanée de DM : la circulation extracorporelle (CEC) lors d'une transplantation cardiaque voire l'oxygénothérapie par membrane extracorporelle (ECMO) , la nutrition parentérale et entérale, la transfusion, la perfusion de médicament.

De ce fait, dans notre étude réalisée au sein du projet Armed®, nous avons évalué la dose d'exposition aux plastifiants reçue chaque jour par les patients *via* en fonction des procédures médicales mises en œuvre. L'estimation de cette dose a été réalisée grâce à un modèle mathématique alimenté par des données recueillies au lit du patient (DM utilisé, durée d'utilisation,...) et par des mesures expérimentales (dosage des plastifiants dans chaque DM, mesure de la surface du DM en contact avec le fluide véhiculé...) La méthodologie générale de l'étude a reposé sur les étapes :

- Inclusion des patients dans l'étude clinique non interventionnelle approuvée par le Comité de Protection des Personnes (CPP Sud-Est VI, AU 1082).
- Pour chaque patient, recensement quotidien des DM en PVC utilisés ainsi que leur durée d'utilisation.
- Détermination, pour chaque référence de DM utilisé du ou des plastifiants qu'il contient et en quelle quantité.
- Estimation de la dose d'exposition des patients à chaque plastifiant : dans un premier temps, pour chaque DM, nous avons évalué la quantité de plastifiant potentiellement relarguée vers le patient. Ensuite pour chaque patient, à partir de la liste des DM utilisés pendant sa prise en charge, nous avons estimé les doses de plastifiants auxquelles il a été exposé sur 24 heures et, en moyenne, pendant la durée de l'étude (6 jours maximum).
- Comparaison de la dose d'exposition journalière aux valeurs des doses journalières tolérées (DJT) propres à chaque plastifiant.
- Evaluation des doses d'exposition à chaque plastifiant en fonction des types de prises en charge thérapeutique (perfusion, oxygénothérapie, circulation extracorporelle,).

En perspective, l'exposition journalière aux plastifiants sera évaluée également par la mesure des concentrations des métabolites dans les urines des patients. Ce biomonitoring permettra d'avoir une vision de l'exposition réelle du patient quelles que soient les sources d'exposition (DM et autres) Une analyse biostatistique sera ensuite réalisée pour voir s'il existe une corrélation entre l'AJ en plastifiants par les DM et les concentrations des métabolites urinaires des plastifiants.

# EXPOSITION DES PATIENTS AUX PLASTIFIANTS EN CHIRURGIE CARDIOVASCULAIRE VIA LES DM

## RESUME

Les patients hospitalisés en chirurgie cardiovasculaire (CCV) subissent plusieurs prises en charges médicales. Durant ces actes médicaux, de nombreux dispositifs médicaux (DM) en polychlorure de vinyle (PVC) plastifié sont utilisés. Lors du contact entre un DM en PVC plastifié et les médicaments perfusés, le sang, ou l'air, les plastifiants peuvent diffuser du matériau vers le liquide ou le gaz et exposer le patient. Le niveau d'exposition des patients aux plastifiants au cours de leur séjour en CCV n'a pas été étudié.

D'où l'objectif de cette étude d'évaluer l'exposition des patients aux différents plastifiants du PVC en fonction de leurs prises en charge médicales lors d'une hospitalisation en CCV.

La dose d'exposition des patients à chaque plastifiant ou l'apport journalier AJ en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de masse corporelle/j a été déterminée avec l'aide d'un modèle mathématique à partir des données recueillies en clinique. L'évaluation du risque d'exposition en fonction du type de prise en charge médicale a été réalisé en comparant les doses de plastifiants auxquelles les patients sont exposés aux valeurs toxicologiques de référence DJT de chaque composé.

Les résultats montrent que l'exposition aux plastifiants des patients en chirurgie cardiaque dépend du type de prise en charge et du type de plastifiant utilisé dans les DM. Les patients de CCV sont très exposés au DEHP. La dose d'exposition dépasse les valeurs toxicologiques de référence (DJT). Cette exposition provient principalement de la CEC et concerne 90% des patients le premier jour au bloc opératoire. Les expositions au DEHP par la transfusion, l'oxygénothérapie et les DM spécifique de la réanimation sont moindres mais dépassent parfois les DJT. Les expositions au DINP et au DINCH provenant principalement des DM de la nutrition parentérale et de perfusion restent élevées et excèdent souvent les valeurs toxicologiques de référence. Le TOTM est un plastifiant intéressant car il diffuse peu et les niveaux d'exposition restent bien au-delà de la DJT du composé.

Etant donné le risque toxique avéré du DEHP, il est important d'en limiter l'utilisation, particulièrement via les DM de CEC. Des solutions alternatives existent comme le TOTM. Il conviendra d'être vigilant avec d'autres plastifiants alternatifs comme le DINP ou le DINCH qui sont susceptibles d'exposer les patients à des taux excédant les doses tolérables journalières.

## Abréviations

AJ ou DI - Apport Journalière ou Daily Intake)

ARMED® - Assessment and Risk Management of Medical Devices in plasticized polyvinylchloride

ATBC - Acetyl tributyl citrate  
BBP - phtalate de benzyle et de n-butyle  
CCV - Chirurgie cardiovasculaire  
CEC - Circulation Extra-Corporelle  
CHU - Centre Hospitalier Universitaire  
CMR 1B - Substances dont le potentiel cancérigène pour l'être humain est supposé  
DEHA - Di-(2-ethylhexyl) adipate  
DEHP - Di-(2-ethylhexyl) phtalate  
DEHT - Di-(2-ethylhexyl) terephtalate  
DINCH - Di(isononyl)-cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid  
DINP - Di-(isononyl) phtalate  
DJT ou TDI - Dose Journalière Tolérable ou Tolerable Daily Intake  
DM - dispositifs médicaux  
DNEL Derived No-Effect Levels  
ECMO - Extracorporeal Membrane Oxygenation  
NOAEL - No Observable Adverse Effect Level  
PVC - polychlorure de vinyle  
SCENIHR - Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks  
TOTM - Tri-octyltrimellitate  
ECLS - Extracorporeal Life Support

## 1. INTRODUCTION

En chirurgie cardiovasculaire (CCV), de nombreux dispositifs médicaux (DM) en polychlorure de vinyle (PVC) plastifié sont utilisés. Lors du contact entre un DM en PVC plastifié et un fluide (le sang dans le cas d'une circulation extracorporelle, médicament lors d'une perfusion, voire gaz en cas d'oxygénothérapie), les plastifiants peuvent diffuser du matériau vers le liquide ou le gaz et exposer le patient. Jusqu'en 2010, le **DEHP** (Di-(2-ethylhexyl) phtalate) a été le plastifiant le plus utilisé dans les DM, mais après plusieurs études scientifiques il a été classé CMR 1B selon le règlement CLP (Union européenne, R 2008) [1] et son utilisation a été restreinte dans les DM [2]. Le **DEHP** est progressivement remplacé par des plastifiants alternatifs tels que le **DINP** (Di-(isononyl) phtalate), **DINCH** (Di(isononyl)-cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid), **DEHT** (Di-(2-ethylhexyl) terephtalate), **DEHA** Di-(2-ethylhexyl) adipate, **TOTM** (Tri-octyltrimellitate) et **ATBC** (Acetyl tributyl citrate) proposés par les experts du SCENIHR 2008 [3]. Ces derniers ont également recensé des actes médicaux à haut risque d'exposition au **DEHP** afin de cibler les substitutions sur les DM utilisés dans ces situations, à savoir la transfusion, l'oxygénation par membrane extracorporelle (ECMO) et la circulation extracorporelle (CEC) lors d'une transplantation cardiaque, l'hémodialyse, la nutrition parentérale et entérale, et les procédures multiples (perfusions, nutrition, etc.) [3]. Tous ces actes sont réalisés en CCV en utilisant des DM contenant des quantités non négligeables de

plastifiants (**DEHP** et plastifiants alternatifs) allant de 24,1 - 45,5 g de plastifiant pour 100 g de PVC [4].

Pour évaluer l'exposition des patients aux plastifiants provenant des DM, l'apport journalier AJ (en anglais DI ; Daily Intake) ou dose d'exposition en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de masse corporelle/j est calculé. L'AJ constitue une valeur globale résultant des expositions par les différentes voies (orale, cutanée, pulmonaire, ...).

L'AJ peut être déterminée à l'aide de modèles mathématiques conçus à partir de données expérimentales mesurant les quantités de plastifiants relargués par les DM concernés en contact avec différents stimulants représentatifs de la situation clinique.

Pour évaluer le risque d'exposition des plastifiants aux DM les valeurs d'AJ sont comparées aux valeurs toxicologiques de référence DJT (dose journalière tolérable ou TDI de l'anglais, Tolerable Daily Intake) représentant la quantité d'une substance qu'un individu peut théoriquement ingérer quotidiennement sans risque pour la santé. Les DJT du **DEHP**, **DINP**, **DINCH**, **DEHT**, **DEHA**, **TOTM** et **ATBC** sont respectivement de 50, 150, 400, 3950, 300, 1130, 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  masse corporelle/j [5].

Quelques études montrent que les quantités de plastifiants relargués par certains DM (ECMO, hémodialyse, transfusion, nutrition entérale) sont supérieures aux DJT [5–15], alors que d'autres présentent des résultats avec des valeurs inférieures aux DJT [13,16–18]. Cette différence de migration est analysée dans quelques études *ex vivo* montrant que les relargages des plastifiants à partir des DM et par la suite l'exposition des patients à ces composés dépendent des propriétés physico-chimiques de chaque plastifiant, du milieu en contact avec le DM et d'autres paramètres comme la température ou la durée de contact [6,12,19–29].

Actuellement il n'existe pas, à notre connaissance, d'études mesurant l'exposition des patients aux différents plastifiants du PVC en fonction de leurs prises en charge médicales. Dans le cadre de notre étude, nous nous proposons d'estimer l'exposition des patients de CCV (dont les prises en charge médicales sont multiples, telles que la CEC, la perfusion, la nutrition,...) aux plastifiants *via* les DM utilisés lors de leur séjour au bloc opératoire puis en service de réanimation et/ou en unité de soin (service de CCV). L'apport quotidien en chaque plastifiant *via* les DM (AJ) sera estimé par un modèle mathématique à partir des données recueillies en clinique (recensement et analyse de tous les DM utilisés pour chaque patient pendant leur hospitalisation). Les doses de plastifiants auxquelles les patients sont exposés seront comparées aux DJT de chaque composé, ce qui permettra d'évaluer le risque en fonction du type de prise en charge médicale.

## **2. MATERIEL ET METHODES**

### **2.1 Méthodologie générale**

L'exposition des patients aux plastifiants en chirurgie cardiaque *via* les DM a été évaluée dans le cadre du projet ARMED® (Assessment and Risk Management of Medical Devices in plasticized polyvinylchloride) au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Clermont-Ferrand.

La méthodologie générale de l'étude repose sur plusieurs étapes :

- Inclusion des patients dans l'étude clinique non interventionnelle approuvée par le Comité de Protection des Personnes (CPP Sud-Est VI, AU 1082).
- Pour chaque patient, recensement quotidien des DM en PVC utilisés ainsi que leur durée d'utilisation.
- Détermination, pour chaque référence de DM utilisé du ou des plastifiants qu'il contient et en quelle quantité.
- Estimation de la dose d'exposition des patients (AJ ?) à chaque plastifiant : dans un premier temps, pour chaque DM, nous avons évalué la quantité de plastifiant potentiellement relarguée vers le patient. Ensuite pour chaque patient, à partir de la liste des DM utilisés pendant sa prise en charge, nous avons estimé les doses de plastifiants auxquelles il a été exposé sur 24 heures et, en moyenne, pendant la durée de l'étude (6 jours maximum).
- Comparaison de la dose d'exposition journalière (AJ ?) aux valeurs des doses journalières tolérées (DJT) propres à chaque plastifiant.
- Evaluation des doses d'exposition (AJ ?) à chaque plastifiant en fonction des types de prises en charge thérapeutique (perfusion, oxygénothérapie, circulation extracorporelle,).

### **2.2 Inclusion des patients dans l'étude**

Les patients inclus dans l'étude sont des patients majeurs qui ont été hospitalisés dans les services suivants : bloc CCV, services de réanimation de CCV, et service de CCV du CHU de Clermont-Ferrand.

Les critères d'inclusion des patients ont été :

- patient bénéficiant d'un régime de sécurité sociale ou en bénéficiant par l'intermédiaire d'une tierce personne
- patient hospitalisé en CCV
- patient majeur
- patient équipé d'une sonde urinaire pendant toute la durée de son hospitalisation
- séjour hospitalier prévu à l'inclusion  $\geq$  48 heures

- patient subissant pendant son séjour au moins 1 des procédures médicales suivantes : nutrition entérale, nutrition parentérale, hémodialyse, ECMO/ECLS, CEC lors d'une chirurgie cardiaque, échanges plasmatiques.

Critères de non-inclusion :

- patient ayant subi au moins une des procédures médicales citées dans les 14 jours précédant leur hospitalisation : un patient peut donc être réinclus 14 jours après la fin de l'étude
- patient anurique, dont la diurèse est  $< 300\text{mL}/24$  heures pendant au moins 72 heures précédant l'inclusion
- patient insuffisant hépatique défini par l'établissement d'un score de Child B ou C
- patient transféré d'un autre établissement et porteur d'un système de sondage urinaire en PVC (sonde et/ou poche de recueil)
- patient ne bénéficiant pas d'un régime de sécurité sociale ou n'en bénéficiant par l'intermédiaire d'une tierce personne
- personne privée de liberté par une décision judiciaire ou administrative
- personne séjournant dans un établissement sanitaire ou social
- personne majeure sous protection légale
- femme enceinte ou allaitant
- patient sous tutelle ou sous curatelle avec l'établissement du diagnostic
- patient déjà inclus dans un protocole de recherche clinique.

Critères d'exclusion:

- décès du patient
- arrêt du sondage urinaire
- patient devenant anurique (diurèse  $24\text{h} < 300\text{mL}$ ) en cours d'étude

Les patients pouvaient être inclus en urgence, c'est-à-dire sans non opposition écrite préalable en raison de la gravité de leur situation pathologique. Le patient, une fois réveillé/conscient, pouvait décider de ne pas continuer à participer à l'étude.

La durée maximale d'inclusion dans l'étude a été de 6 jours (J1, jour de l'inclusion puis J2 à J6, période de recueil des données).

### **2.3 Recensement des DM en PVC plastifié**

Pendant le biomonitoring quotidien, les DM en PVC plastifié utilisés chez les patients inclus dans l'étude ont été recensés ainsi que leur durée d'utilisation *via* des cahiers d'observation (**Annexe 3.1**). Ce recueil a été réalisé par des étudiants en 5<sup>ème</sup> année de la Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand présents dans les services concernés. En dehors des périodes de présence des étudiants (nuit et week-end), les emballages des DM ont été déposés par les infirmières dans un conteneur prévu à cet effet, la date de pose du DM étant notée sur l'emballage. En cas de retrait d'un DM, l'heure de l'acte a été inscrite dans le dossier de soin. Les étudiants ont ensuite fait la mise à jour des cahiers d'observation.

Les données recueillies dans les cahiers d'observation ont ensuite été saisies dans la base de données conçue à cet effet à l'aide du logiciel ACCESS®.

## 2.4 Dosage des plastifiants dans les DM

Les références des DM en contact avec les patients ont été extraits de la base des données ACCESS®. La composition en plastifiants de ces DM plastifiés a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) après extraction en phase liquide selon la méthode publiée par Bourdeaux et al. 2016 [4]. Les différentes étapes de cette analyse sont décrites ci-dessous.

### Préparation des échantillons

Un échantillon de DM (tubulure en PVC) d'environ 10 mg est découpé au scalpel puis pesé précisément sur une balance de précision. L'échantillon est mis en contact durant 1 heure avec 25 mL de chloroforme contenant l'étalon interne (BBP) à 20 µg / mL pour le dosage des plastifiants majoritaires (20 à 63 g / 100 g de PVC) ou le BBP à 2 µg / mL pour les dosages des plastifiants minoritaires (0,16 à 4,73 g / 100 g de PVC). Après une heure de contact, la solution a été diluée au dixième dans le chloroforme en vue de l'analyse des plastifiants majoritaires ou analysée sans dilution pour les plastifiants minoritaires. Les échantillons ont été ensuite analysés en GC-MS.

### Analyse par GC-MS

La méthode développée par Bourdeaux et al. 2016(4) a permis d'identifier et de quantifier 7 plastifiants (**DEHP**, **DINP**, **DINCH**, **DEHT**, **DEHA**, **TOTM**, **ATBC**). L'appareillage est constitué d'un chromatographe phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse Clarus 500 (Perkin Elmer, USA). La colonne utilisée est une colonne Optima 5 Accent (30 m x 0,25 µm x 0,25 mm diamètre interne) (Macherey-Nagel, Allemagne). Le gaz vecteur (Hélium) est maintenu à un débit de 1,2 mL / min et le débit de fuite fixé à 20 mL / min. La température du four est augmentée de 200 à 300°C à raison de 20°C/min et le plateau maintenu 7 minutes à 300°C. La température de l'injecteur est fixée à 300°C et celle de la source électronique à 200 °C. L'énergie d'ionisation de la source est de 70 eV. Un microlitre de chaque échantillon est injecté. Les courbes d'étalonnage comportent 5 points de calibration allant de 0,1 à 25 µg / mL pour chaque plastifiant et 2 µg / mL de BBP. Une courbe polynomiale d'ordre 3 et une pondération  $1/x^2$  favorisent le passage de la courbe par les points de faible concentration. Les courbes d'étalonnage ont des coefficients de détermination ( $r^2$ ) supérieurs à 0,997 pour tous les plastifiants. La méthode présente une bonne précision et exactitude avec des coefficients de variation inférieurs à 10 % pour tous les plastifiants avec des rendements d'extraction de l'ordre de 100% pour tous les plastifiants sauf le **DINP** (84,5%) et le **TOTM** (89,2%).

Pour quantifier les plastifiants dans le DM, nous avons réalisé des analyses sur trois échantillons (≈ 10 mg) de chaque DM et nous avons calculé les concentrations moyennes. Les

résultats ont été exprimés en pourcentage de plastifiant dans les DM (g de plastifiant / 100 g de PVC plastifié).

## 2.5 Evaluation de la dose d'exposition

La quantité de plastifiant relarguée par chaque DM a été estimée à partir d'un modèle mathématique basé sur la première loi de Fick dont l'équation est la suivante :

$$M = D_{app} \times C \times 1000 \times 1,27 \times S \times t$$

M : masse de plastifiant ayant diffusé à partir du PVC exprimée en mg

$D_{app}$  : coefficient de diffusion apparent de chaque plastifiant à partir du PVC (en cm /min).

$D_{app}$  est déterminé expérimentalement selon la méthodologie présentée ci-dessous.

C : concentration en plastifiant dans le DM en g par g de PVC

1000 : facteur multiplicateur pour transformer la masse de g en mg

1,27 : masse volumique du PVC en g/cm<sup>3</sup>

S : surface de PVC plastifié en cm<sup>2</sup>

T : temps d'exposition (= durée d'utilisation) en minute.

**Le coefficient de diffusion apparent ( $D_{app}$ )** de chaque plastifiant à partir du PVC a été déterminé par l'expérience. Ainsi des tubulures en PVC de dimension standardisée ( $\approx 0,33$  dm<sup>2</sup>) plastifiées ont été mises en contact avec 200 mL d'un mélange éthanol/eau (50/50 ; v/v) à 25°C pendant plusieurs mois. La durée de mise en contact doit permettre d'atteindre l'état d'équilibre. Des prélèvements ont été réalisés après 1, 2, 7, 14, 21 et 31 jours. Les concentrations du plastifiant dans le simulant ont été déterminées par GC-MS (**Tableau en Annexe 3.2**). Pour calculer le coefficient de diffusion apparent ( $D_{app}$ ) nous nous basons sur la première loi de Fick. Le  $D_{app}$  a été calculé en traçant la courbe  $Q/(C*S) = f(\text{temps})$ , Q est la quantité du plastifiant relargué (g), C est la concentration initiale du plastifiant dans le DM (g/cm<sup>3</sup>) et S est la surface de la tubulure en contact avec le simulant (cm<sup>2</sup>).  $D_{app}$  est la pente de la courbe (**Figures en Annexe 3.3**). Les valeurs des coefficients de diffusion apparents de chaque plastifiant dans le PVC sont présentées dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1. Coefficient de diffusion apparent des plastifiants.**

	TOTM	DEHT	DEHP	DINP	ATBC	DEHA	DINCH
Coefficient de diffusion apparent ( $D_{app}$ ) (cm/ min)	$8,33. 10^{-9}$	$5,69. 10^{-8}$	$4,04.10^{-7}$	$9,34.10^{-7}$	$1,43.10^{-6}$	$7,15.10^{-8}$	$2,0571 \times 10^{-7}$

**La concentration en plastifiant** dans chaque référence DM est déterminée par GC-MS après extraction selon la technique décrite par Bourdeaux et al [4].

**La masse volumique du PVC** a été fixée à 1,27. Il s'agit d'une valeur moyenne, sachant que la masse volumique du PVC peut varier de 1,16 et 1,38 en fonction de la nature et de la quantité de plastifiant qu'il contient.

**La surface** de chaque DM en contact avec des fluides a été mesurée. Pour effectuer cette mesure, nous avons mesuré pour chaque DM la surface en contact avec le patient de façon directe (fluides biologiques comme le sang *via* les lignes de circulation extracorporelle) ou indirecte (*via* les médicaments perfusés par exemple).

La dose de chaque plastifiant relarguée pendant la durée d'utilisation du DM est ramenée au poids du patient (dose en  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ). Pour chaque patient, nous avons calculé la dose d'exposition à chaque plastifiant pendant les 24 premières heures (à J1) puis la moyenne de cette exposition par jour pendant la durée totale de l'étude (la durée maximum est de 6 jours). La dose d'exposition est exprimée en  $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ .

## **2.6 Exposition des patients aux plastifiants en fonction de la prise en charge thérapeutique du patient**

Nous avons comparé les doses d'exposition aux plastifiants en fonction des types de prise en charge thérapeutique du patient. Ainsi nous pouvons évaluer l'impact d'une oxygénothérapie, d'une nutrition parentérale, d'une nutrition entérale, d'une CEC, etc... sur l'exposition aux différents plastifiants. L'exposition des patients à J1 en plastifiants majoritaires et minoritaires ainsi que l'exposition moyenne journalière des patients à ces plastifiants par type de prise en charge pendant l'hospitalisation en CCV ont été calculées.

## **2.7 Comparaison de la dose d'exposition aux DJT**

Les doses d'exposition (AJ) obtenues en  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$  ont été comparées aux DJT (TDI de l'anglais, Tolerable Dose Intake) de chaque plastifiant. La DJT de référence a été obtenue après exposition par voie orale [5]. En effet, la DJT des plastifiants par voie parentérale n'a pas été déterminée. Par ailleurs, nous nous trouvons ici dans des cas de multi-expositions par des voies variées (orale, pulmonaire). Les TDI de chaque plastifiant sont présentées dans le tableau 2.

**Tableau 2. Les valeurs des doses journalières tolérables (DJT ou TDI en anglais) par voie orale du DEHP et des plastifiants alternatifs [5].**

	DEHP	DINP	DINCH	DEHT	DEHA	TOTM	ATBC
DJT (TDI) µg / kg / j	50	150	400	3950	300	1130	1000
Références	EFSA 2005a (31)	EFSA 2005b (32)	NICNAS 2011 (33)	ECHA 2014b (34)  Danich EPA 2014 (35)	Stuer- Lauridsen et al. 2001 (36)	ECHA 2014b (34) Danich EPA 2014 (35)	Danich EPA 2014 (35)

### 3. RESULTATS

#### 3.1 Caractéristiques des patients

66 patients ont été inclus dans l'étude. Leurs caractéristiques sont présentées dans le **Tableau 3**. L'évolution du nombre des patients pendant l'étude figure dans le **Tableau 4**.

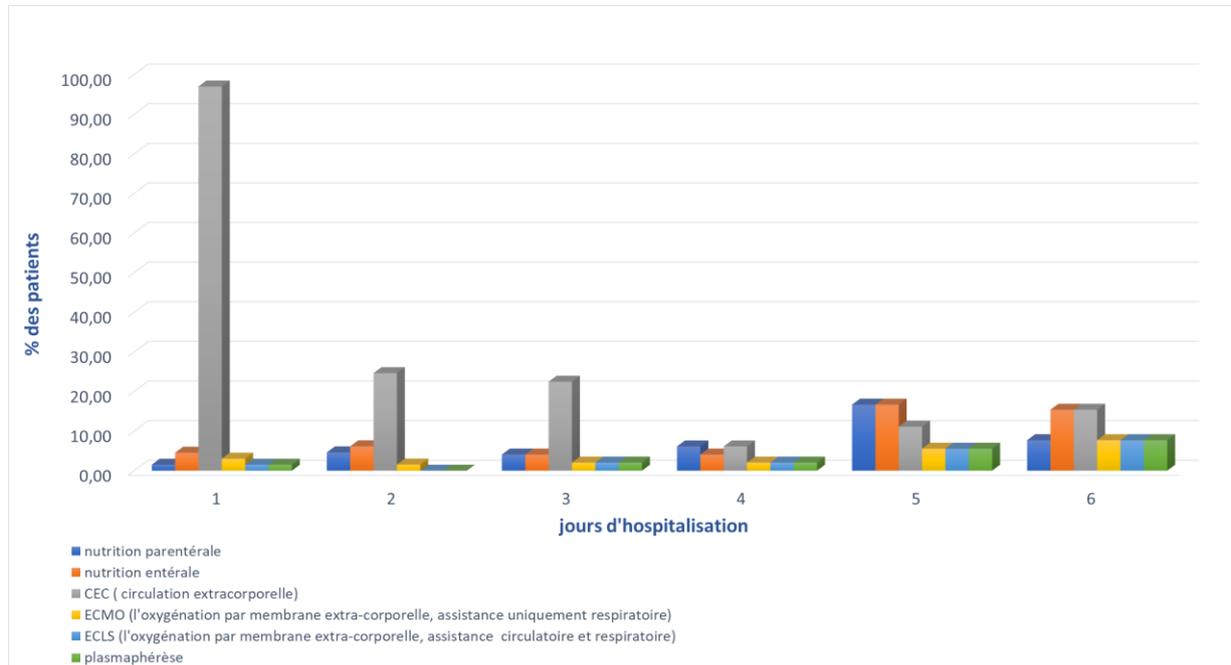
**Tableau 3. Caractéristiques des patients.**

Patients inclus dans l'étude	66 (54 hommes, 12 femmes)
Age (années) Médiane [espace interquartile]	69,5 [63 ; 77]
Poids (kg) Médiane [espace interquartile]	79,5 [66 ; 88]
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) Médiane [espace interquartile]	27,34 [24,6 ; 29,24]

**Tableau 4. Evolution du nombre de patients selon les jours d'hospitalisation pendant les 6 jours de l'étude.**

	Jour d'hospitalisation	Nombre des patients	Nombre de recueils de données
	j1	66	66
	j2	65	65
	j3	49	49
	j4	33	33
	j5	18	18
	j6	13	13
<b>TOTAL</b>	6 jours	66	244

Les prises en charge dont ont bénéficiées les patients en CCV pendant la durée de l'étude sont présentées dans la **Figure 1**.

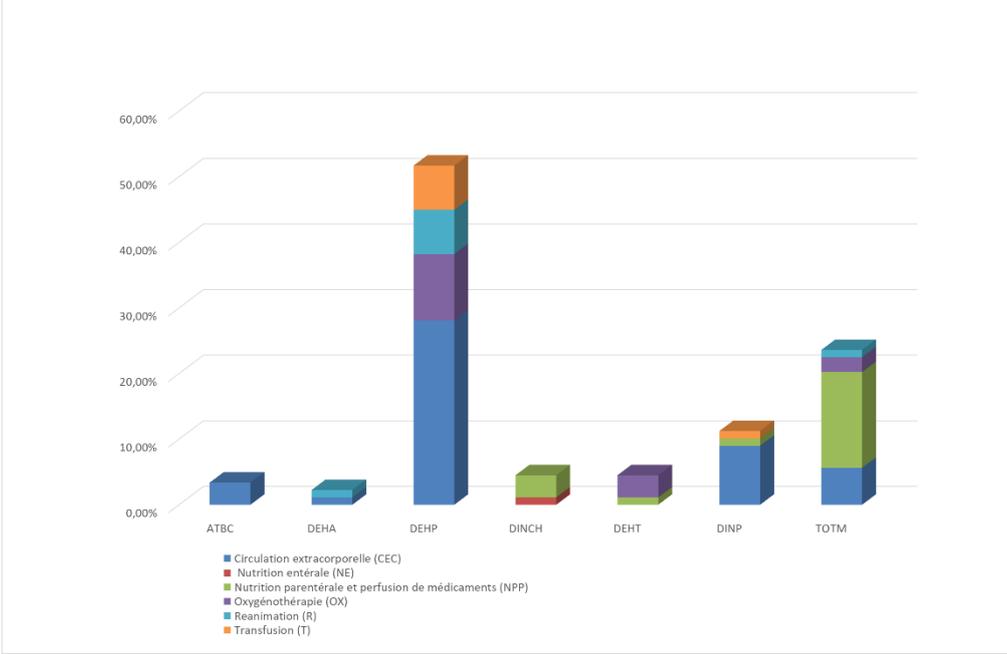


**Figure 1. Types de prise en charge dont ont bénéficiés les patients pendant la durée de l'étude.**

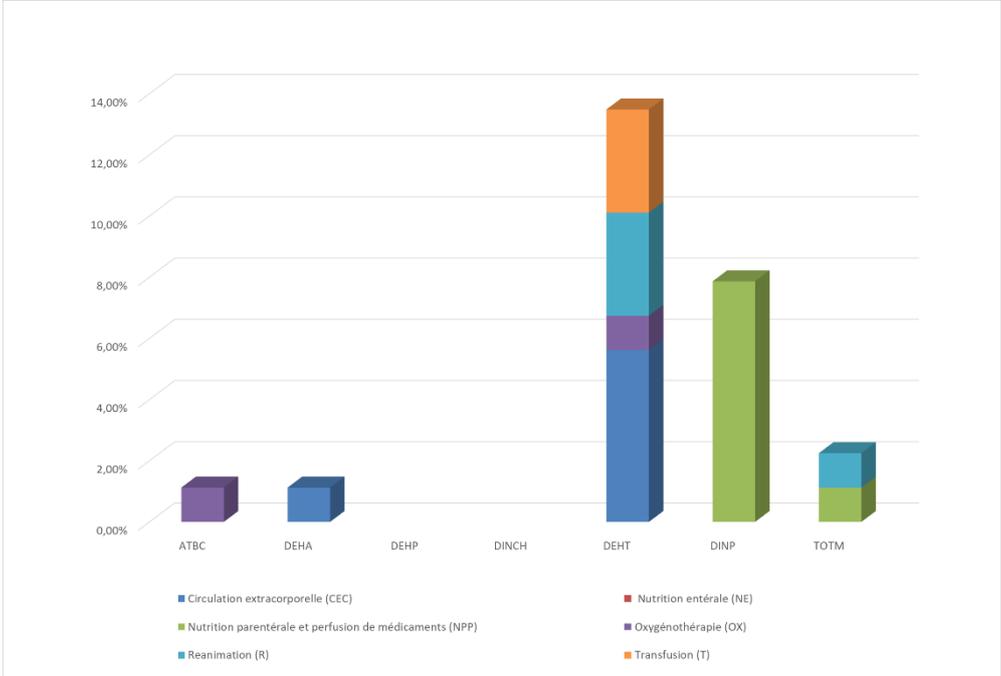
### 3.2 Dosage des plastifiants dans les DM

89 DM en PVC plastifié ont été recensés *via* les cahiers d'observation. La composition en plastifiants de chacun des DM est présentée dans le **Tableau en Annexe 3.4**.

Les résultats de la répartition des plastifiants majoritaires et minoritaires en fonction des types de DM analysés sont présentés dans les **Figures 2 et 3**.



**Figure 2. Répartition des plastifiants majoritaires en fonction des types de DM analysés.**



**Figure 3. Répartition des plastifiants minoritaires en fonction des types de dispositifs médicaux analysés.**

Parmi les 89 DM utilisés dans l'étude 51,7% sont plastifiés au **DEHP**, majoritairement des DM destinés à la CEC et l'oxygénothérapie. Les plastifiants alternatifs au **DEHP** ont été intégrés dans 4,5% des DM pour le **DINCH** et le **DEHT**, 11,2% pour le **DINP**, 23,6% pour le **TOTM**, 3,4% pour l'**ATBC** et 2,2% pour le **DEHA** (Figure 2).

La quantité de plastifiants dans le PVC des DM, classés comme majoritaires dans notre étude va de 20,47-45,05 [20,47 ;56,10] (g de plastifiant / 100 g de PVC plastifié) (Tableau 5).

**Tableau 5. Quantité des plastifiants majoritaires dans les différents types de dispositifs médicaux analysés (en g / 100g de PVC plastifié). Les valeurs sont exprimées par la médiane [valeur minimale ; valeur maximale].**

	ATBC	DEHA	DEHP	DINCH	DEHT	DINP	TOTM
Circulation extracorporelle (CEC)	23,07 [23,07; 23,07]		33,62 [29,60; 37,60]			34,57 [33,10; 36,00]	45,05 [45,05; 45,05]
Nutrition entérale (NE)				32,26 [32,26; 32,26]			
Nutrition parentérale et perfusion de médicaments (NPP)				33,05 [29,30; 44,30]	43,82 [43,82:43,82]	34,39 [34,39; 34,39]	30,87 [28,06; 38,10]
Oxygénothérapie (OX)			24,59 [23,40; 3,30]		23,90 [23,90; 3,90]		44,64 [44,63; 48,33]
Réanimation (R)		20,47 [20,47; 20,47]	28,89 [26,30; 37,70]				42,06 [42,06; 42,06]
Transfusion (T)			39,25 [36,00; 56,10]			35,80 [35,80; 35,80]	

Concernant les plastifiants dits minoritaires, leur quantité varie en fonction de la limite de quantification propre à chaque plastifiant i.e. de 0,16 à 4,73 g de plastifiant / 100 g de PVC plastifié (Tableau 6).

**Tableau 6. Quantité des plastifiants minoritaires dans les différents types de dispositifs médicaux analysés (en g / 100g de PVC plastifié). Les valeurs sont exprimées par la médiane [valeur minimale ; valeur maximale].**

	ATBC	DEHA	DEHP	DINCH	DEHT	DINP	TOTM
Circulation extracorporelle (CEC)		3,86 [3,86; 3,86]			4,73 [4,73; 4,73]		
Nutrition entérale (NE)							
Nutrition parentérale et perfusion de médicaments (NPP)					0,43 [0,14; 0,95]		3,95 [3,92; 3,92]
Oxygénothérapie (OX)	0,54 [0,54; 0,54]				0,23 [0,23; 0,23]		
Réanimation (R)					0,16 [0,14; 0,42]		0,26 [0,26; 0,26]
Transfusion (T)					0,14 [0,14; 0,14]		

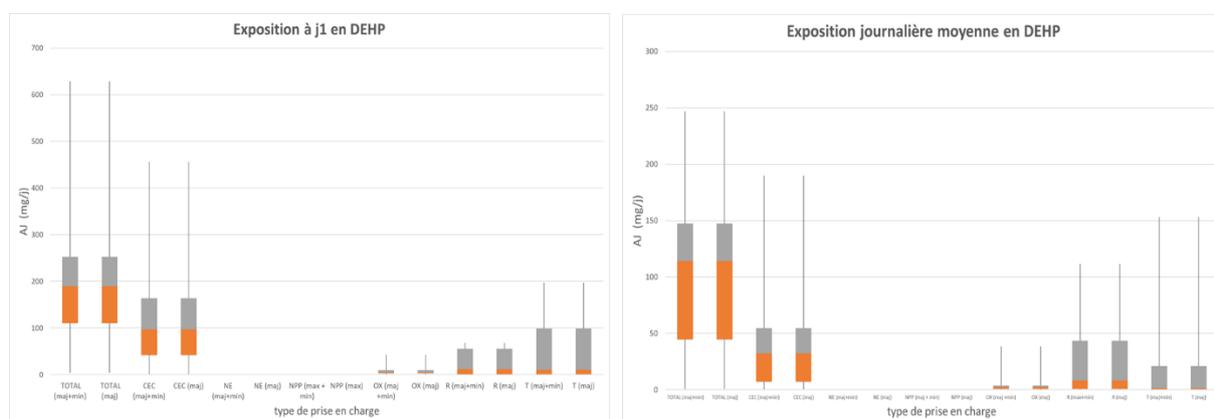
### 3.3 Evaluation de la dose d'exposition

Les doses d'exposition (mg / j) aux différents plastifiants ont été estimées pour chaque patient avec le modèle mathématique (Loi de Fick).

### 3.4 Exposition des patients aux plastifiants en fonction de la prise en charge thérapeutique du patient

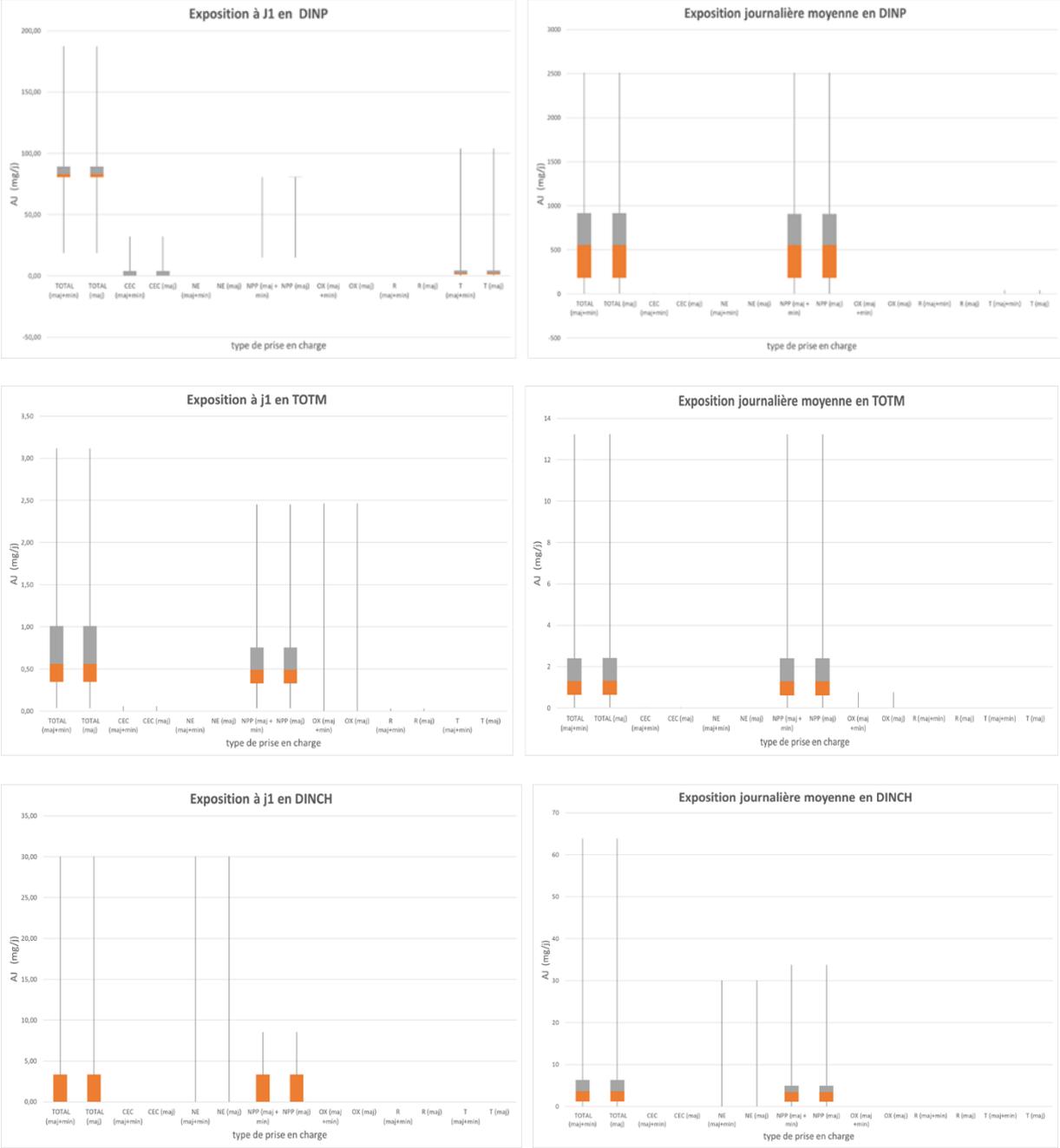
A partir des résultats individuels, une analyse par type de prise en charge a été effectuée pour l'ensemble des patients.

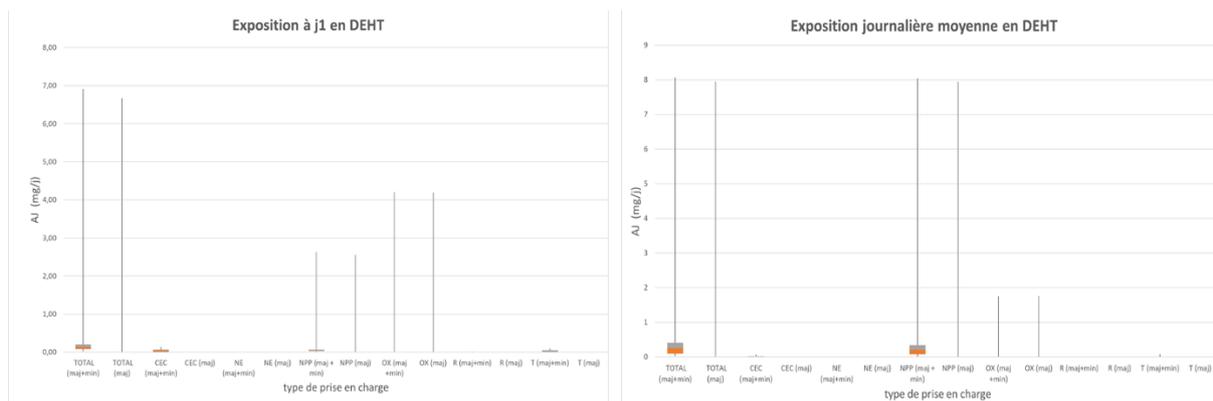
La **Figure 4** présente la dose d'exposition ou l'apport journalier (AJ) en **DEHP** *via* les DM lors du premier jour en CCV et en moyenne par jour pendant la durée d'hospitalisation.



**Figure 4. Apport journalier (AJ) en DEHP (en mg / j) *via* les DM aux patients hospitalisés en CCV (DEHP en tant que plastifiant majoritaire et DEHP total, majoritaire + minoritaire) par type de prise en charge. Les valeurs sont exprimées par la médiane et l'espace interquartile (les barres correspondant aux valeurs extrêmes Min-Max).**

L'exposition à J1 et l'exposition moyenne journalière des patients aux plastifiants **DINP**, **DINCH**, **TOTM** et **DEHT** sont présentées dans la **Figure 5**.





**Figure 5. Apport journalier (AJ) des plastifiants (en mg/j) *via* les DM aux patients hospitalisés en CCV (le plastifiant en tant que plastifiant majoritaire et en total, majoritaire + minoritaire) par type de prise en charge. Les valeurs sont exprimées par la médiane et l'espace interquartile (les barres correspondant aux valeurs extrêmes Min-Max).**

Pour les autres plastifiants **DEHA** et **ATBC**, les AJ sont très faibles. L'exposition moyenne pour **ATBC** et **DEHA** en tant que plastifiants majoritaires et minoritaires est de 0,04 mg / j (**ATBC**) et nulle pour le **DEHA**. La médiane des doses d'expositions et l'espace interquartile sont nuls également. Les valeurs maximales de l'exposition (1,66 et 0,03 mg / j) de l'**ATBC** et **DEHA** proviennent de 3 DM de CEC (canules veineuses et artérielles) et 1 DM de réanimation (cathéter de mesure de pression Swann-Ganz) qui a été utilisé seulement deux fois pendant l'étude.

### 3.5 Comparaison de la dose d'exposition aux valeurs DJT

La dose d'exposition (AJ) en  $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$  a été calculée à partir de la dose d'exposition à j1 et la dose moyenne journalière divisées par le poids du patient. La comparaison entre les doses d'exposition en  $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$  et les valeurs toxicologiques de références DJT sont présentées dans le **Tableau en Annexe 3.5.2**.

Les doses des plastifiants le plus exposants dépassant les DJT sont présentées par type de prise en charge dans le **Tableau 7**.

**Tableau 7. Dose d'exposition à chaque plastifiant ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ ) par prise en charge dépassant les doses journalières tolérables (DJT) pour au moins une des valeurs (médiane et/ou valeur maximale).**

Plastifiant	Prise en charge	Dose d'exposition à J1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ ) Médiane (valeur maximale)	Dose d'exposition moyenne journalière ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ ) Médiane (valeur maximale)	DJT (Dose journalière tolérable) $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$
DEHP	CEC	1217,44 (7906,87)	316,53 (2298,81)	50
	OX	55,66 (527,89)	20,91 (472,90)	
	R	141,77 (854,43)	93,71 (1395,95)	
	T	125,77 (2479,34)	13,69 (1928,37)	
DINP	NPP	1012,28 (1012,28)	4675 (29257,57)	150
	T	27,21 (1306,15)	9,07 (507,94)	
DINCH	NPP		29,02 (410,66)	400

#### 4. DISCUSSION

Notre étude consistait à estimer l'exposition aux plastifiants des patients en chirurgie cardiaque de CHU de Clermont-Ferrand *via* les DM en PVC plastifié. La dose d'exposition journalière à chaque plastifiant (ou apport journalier AJ) *via* les DM a été estimée par un modèle mathématique à partir des données recueillies en clinique (recensement et analyse de tous les DM utilisés pour chaque patient pendant leur hospitalisation). Les DM étant dédiés à des prises en charge médicales particulières (CEC, perfusion, transfusion, ...), cela a permis d'évaluer le niveau d'exposition des patients aux différents plastifiants en fonction de ces actes médicaux.

Au total, 66 patients ont été inclus dans l'étude. Seulement 19,6% ont été suivis pendant la durée totale de l'étude. 25 % des patients sont sortis de l'étude au troisième jour en raison du retrait de la sonde, du transfert dans une autre unité ou d'un décès (**Tableau 4**).

La majorité (97%) des patients inclus dans l'étude clinique ont été opérés sous anesthésie générale de façon programmée pour diverses pathologies cardiaques. Le suivi des patients a ensuite été réalisé en réanimation puis dans le service de CCV. Au bloc opératoire une CEC a été mise en place dans 97% des cas c'est-à-dire dès le premier jour après l'inclusion. Au cours des trois premiers jours, la nutrition entérale ou parentérale est exceptionnelle (<5% des patients). Elle est mise en place au 5<sup>ème</sup> jour pour environ 15% des patients. Concernant les autres prises en charge (ECMO, ECLS et plasmaphérèse, elles sont plus rares et ne concernent que 2% des patients à j1 et 8% des patients à j6. (**Figure 1**).

Parmi les 89 DM utilisés chez les patients et recensés *via* les cahiers d'observation, plus de la moitié sont plastifiés au **DEHP** (51,7%). Les plastifiants alternatifs sont principalement le

**TOTM** (23,6% des DM) et le **DINP** (11%). Le **DEHA** et l'**ATBC** sont très peu utilisés dans les DM en CCV. Le **DEHP** est présent majoritairement dans les DM de CEC, le **TOTM** constituant une alternative pour quelques références de DM. Le **DEHP** est également présent dans les DM d'oxygénothérapie et de transfusion. Il est parfois remplacé par le **DEHT** (oxygénothérapie) et le **DINP** (transfusion). Le **DEHP** a été remplacé dans les DM de la perfusion, et les tubulures de nutrition par du **TOTM**, du **DINCH**, du **DINP** ou du **DEHT**. Le **DINCH** est le seul plastifiant qui a été retrouvé dans les DM de nutrition entérale. A noter que l'utilisation du **TOTM** n'est pas autorisée dans l'agro-alimentaire pour un contact avec les aliments en raison du manque d'étude. Les industriels du DM ne l'ont donc pas intégré dans les DM destinés à la nutrition. Par contre il est très présent dans le domaine de la perfusion (**Figure 2**).

La quantité des plastifiants présents dans le PVC varie de 20,47 à 45,05 g pour 100 g de PVC. (**Tableau 5**). LE **TOTM** est le plastifiant qui présente les plus grandes quantités rapportées à la masse de PVC. Ceci est due à sa moindre capacité de plastification que d'autres composés tel que le **DEHP**. Pour plastifier des tubulures de CEC (DM de fonctionnalité identique) il faudra environ 45 g de **TOTM** *versus* 30 à 35 g de **DEHP** pour 100 g de PVC [4]. Le **DEHP** reste encore très présent dans les DM utilisés en CCV bien qu'il ait été classé CMR 1B (cancérogène, mutagène ou toxique pour la reproduction) en vertu du Règlement CLP (Union européenne, R 2008) [1]. Au vu du risque, la France a légiféré en publiant dès 2012 une loi interdisant l'utilisation de tubulures contenant du **DEHP** dans les services de pédiatrie, de néonatalogie et dans les maternités. L'éviction totale du **DEHP** étant a priori irréalisable, l'arrêté du 13 avril 2017 précise que le taux de **DEHP** ne devra pas dépasser les 0,1% (en masse / masse de matière plastifiée) mais tolère la présence de **DEHP** (jusqu'à des valeurs de 40%) dans les DM de CEC, de dialyse, DM d'assistance respiratoire, les nécessaires pour collecte, préparation et transfusion du sang et des composants sanguins jusqu'au 22 Juillet 2021 pour permettre aux fabricants de trouver des solutions de remplacement.

En ce qui concerne les plastifiants retrouvés de façon minoritaire, que nous pouvons considérer comme des impuretés, on retrouve essentiellement le **DEHT** (**Figure 3**). L'origine de cette contamination peut provenir d'une contamination initiale du **TOTM**. En effet de l'acide ortho-phtalique et l'acide téréphtalique sont souvent présents comme impuretés dans l'acide trimellitique utilisé dans la synthèse du **TOTM** [37]. Cela concerne certains DM de CEC, d'oxygénothérapie plastifiés au **TOTM**. Il est cependant à noter que l'on ne retrouve pas de contamination par le **DEHT** des DM de perfusion plastifiés au **TOTM**. Par ailleurs le **DEHT** est retrouvé comme contaminants dans des DM de transfusion, plastifiés au **DINP**. Une autre source de contamination peut être environnementale (par exemple une contamination des lignes de production des DM si celles-ci sont destinées à fabriquer des DM de composition différente). Cette dernière hypothèse pourrait expliquer également la présence de **DINP** et de **TOTM** comme contaminant de DM de perfusion et de nutrition parentérale (**Figure 3**).

Pendant le contact du DM avec un fluide (biologique, médicamenteux, gazeux), les plastifiants peuvent diffuser du PVC vers le liquide ou le gaz et ainsi exposer le patient aux plastifiants lui-même [12,19–29,38–40].

Le calcul des apports journaliers (AJ) en **DEHP** met en évidence une forte exposition le premier jour (médiane de 189 mg / j) alors que la moyenne journalière sur la durée d'hospitalisation est de 69 mg / j. Ceci s'explique par les prises en plus de 90% d'entre eux ont une CEC le premier jour au bloc opératoire. Celle-ci n'est pas poursuivie au-delà de 24 heures. Les autres dispositifs exposant les patients au **DEHP** sont ceux de réanimation, d'oxygénothérapie et de transfusion : l'exposition *via* ces DM s'étend alors sur la durée du séjour (**Figure 4**). La comparaison des doses de **DEHP** potentiellement reçues par les patients à la dose journalière tolérable du **DEHP** (DJT: 50 µg / kg / j), montre qu'à J1 toutes les prises en charge exposent à des doses bien au-dessus de la DJT. Avec les DM de CEC, plus de 50 % des patients sont exposés à des doses 24 fois plus élevées que la DJT, le patient le plus exposé recevant une dose de 160 fois la DJT. Les expositions par la transfusion et la réanimation sont moindres mais restent au-delà des DJT (médianes de 2 à 3 fois les DJT à J1 et en moyenne journalière pour les DM de réanimation). Hormis pour quelques patients, l'oxygénothérapie expose à des doses moindres de **DEHP**. Les doses médianes estimées à J1 et en moyenne pendant la durée du séjour sont de l'ordre de 20 à 50 µg / kg / j. On peut par ailleurs supposer que ces doses sont surestimées par le modèle. En effet le modèle mathématique utilisé s'applique à des liquides. Dans le cadre de l'oxygénothérapie, c'est un gaz qui diffuse à travers les tubulures : son pouvoir extracteur sur le **DEHP** est probablement moindre que celui d'un mélange éthanol/eau (50/50 ; v/v).

La CEC est connue pour être une prise en charge très exposante au **DEHP** [41]. Cependant il semble possible d'apporter des solutions alternatives pour plastifier les DM de CEC puisque certains fournisseurs disposent de lignes plastifiées au **TOTM**. A noter qu'une autre alternative au PVC est le silicone mais ceci nécessite de changer tout le matériel électronique (pompe de CEC,..) et le silicone présente l'inconvénient de relarguer des particules.

Concernant l'exposition au **TOTM**, **DINCH** et **DINP**, elle provient principalement des DM de la voie parentérale (DM de perfusion et de nutrition parentérale). Le **TOTM** présente des doses d'exposition faibles ((1,31 mg / j) par rapport celle de **DINP** (372,32 mg / j) alors que le nombre de DM de perfusion plastifiés en **TOTM** est plus élevé que celui des DM plastifiés au **DINP**. Cette grande différence d'exposition est essentiellement due aux propriétés physico-chimiques de ces plastifiants expliquant des taux de migration différents [22,23,25,41]. Par ailleurs les prolongateurs plastifiés aux **TOTM** utilisés dans cette étude sont co-extrudés (couche de polyéthylène à l'intérieur de la tubulure en PVC), ce qui réduit la migration du plastifiant.

Le **DINP** est également présent dans les tubulures des transfuseurs, ce qui explique les taux d'exposition à ce plastifiant *via* l'acte de transfusion.

La comparaison des doses de **DINP** potentiellement reçues par les patients à sa dose journalière tolérable (DJT : 150 µg / kg / j), met en évidence une exposition élevée *via* les DM de perfusion. A J1 la dose de **DINP** potentiellement reçue par les patients *via* la perfusion est de 6 à 7 fois la DJT et l'exposition journalière moyenne est plus de 30 fois la DJT pour la moitié des patients, le maximum atteignant près de 200 fois la DJT. Les doses reçues sont acceptables hormis pour quelques patients bénéficiant d'une transfusion.

Concernant le **DINCH**, les doses d'exposition restent très inférieures à la DJT (400 µg / kg / j) à J1 et sur la durée du séjour. Les doses se rapproche de la DJT dans de très rares cas avec un maximum à 410 µg / kg / j.

Les apports journaliers en **TOTM** n'excèdent jamais la DJT (1130 µg / kg / j), les valeurs maximales atteignant 39 µ g/ kg / j à J1 et 166 en moyenne journalière sur la durée de l'hospitalisation. A noter une valeur plus élevée de l'exposition moyenne journalière par rapport à J1, l'utilisation de dispositifs de perfusion au **TOTM** étant plus importante en réanimation et service de CCV qu'au bloc opératoire. Ceci est également retrouvé pour le **DINP** dont la médiane passe de 82,8 mg / j à J1 à 372 mg / j pour l'exposition moyenne journalière pendant la durée du séjour.

L'exposition au **DEHT** est très faible et principalement liée à la présence de ce plastifiant dans les DM en tant que contaminant. (**Figure 5**). Les apports journaliers sont très largement en dessous de la DJT (3950 µg / kg / j). La valeur la plus élevée retrouvée est de 100 g/ kg / j soit près de 40 fois moins que la DJT. En plus le **DEHT** ne présente pas de risques toxicologiques connu chez les animaux [43,44] mais le risque pour l'homme n'est pas encore très étudié.

L'exposition à l'**ATBC** est négligeable. Elle concerne 3 patients à j1 *via* des DM de CEC et ne dépasse pas 125 µg / kg / j pour une DJT à 1000 µg / kg / j. Il en est de même pour le **DEHA** : l'exposition concerne une dizaine de patients à J1 *via* l'oxygénothérapie conduisant à un AJ maximal de 39 µg / kg / j pour une DJT de 1000 µg / kg / j. Dans l'avenir la situation pourrait changer car l'utilisation du **DEHP** dans les DM est interdite à un taux de plus 0,1% (masse de plastifiant / masse de matière) *via* le règlement européen 2017/745 relatif aux DM (2) à moins d'en justifier l'intérêt. Les plastifiants alternatifs tels l'**ATBC** et le **DEHA** sont proposés comme alternatives par les experts du SCENIHR [3]. Le risque toxicologique animal ou humain pour ces deux plastifiants et leur métabolite n'est pas bien établie.

Vu que les doses d'exposition du **DEHP**, du **DINP**, et du **DINCH** (quelques valeurs uniquement) dépassent les valeurs toxicologiques de références (DJT), le risque pour la santé humaine existe. Mais les (DJT) sont élaborées à partir des études toxicologiques fait chez les animaux et ne permettent pas toujours de prédire une toxicité chez l'homme. Actuellement un autre risque préoccupant concernant l'exposition au **DEHP**, au **DINP** et au **DINCH** est le risque lié aux effets perturbateurs endocriniens. Swan et al. [45] met ainsi en évidence l'effet perturbateur endocrinien du **DEHP**. D'autres étude de plus récentes [46–48] démontrent les

effets perturbateurs endocriniens des métabolites du **DINP** et du **DINCH** chez l'homme. Cependant, dans la situation étudiée (chirurgie cardiaque) le risque de perturbation endocrinienne via les plastifiants issus des DM peut être considéré comme négligeable du fait d'une exposition de courte durée et de l'âge des patients (adulte). Le principal risque toxique, s'il existe, pourrait être un risque cytotoxique des plastifiant et de leurs métabolites primaires sur les cellules sanguines lors de la CEC.

## 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'exposition aux plastifiants des patients en chirurgie cardiaque dépend du type de prise en charge et du type de plastifiant utilisé dans les DM. Les patients de CCV restent très exposés au **DEHP**. Les doses d'exposition au **DEHP** dépassent les valeurs toxicologiques de référence (DJT). Nous pouvons s'attendre à ce que la situation change et que le **DEHP** soit remplacé progressivement dans les DM suite à la restriction d'utilisation par le Règlement Européen 2017/745 qui entrera en vigueur le 26 Mai 2020. Les expositions au **DINP** et au **DINCH** restent cependant élevées et dépassent les valeurs toxicologiques de référence, ce qui n'en fait pas de bons candidats pour remplacer le DEHP. Dans l'avenir, les industriels des DM devraient privilégier l'utilisation des plastifiants qui migrent moins et présentent un profil toxicologique intéressant comme le **DEHT** ou le **TOTM**. Notre étude a mis en évidence que l'utilisation de TOTM dans plusieurs DM de perfusion mais également de CEC, n'expose pas le patient de chirurgie cardiaque à des doses toxiques : en effet, les taux obtenus sont très en dessous des valeurs de DJT du plastifiant. Mais qu'en sera-t-il si tous les DM sont plastifiés au TOTM ?

## REFERENCES

1. LE PARLEMENT EUROPÉEN ET LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE. Règlement CLP 1272/2008/ce relatif à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges - 1272-2008-clp.pdf
2. THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. REGULATION (EU) 2017/ 745 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL - of 5 April 2017 - on medical devices, amending Directive 2001/ 83/ EC, Regulation (EC) No 178/ 2002 and Regulation (EC) No 1223/ 2009 and repealing Council Directives 90/ 385/ EEC and 93/ 42/ EEC.
3. SCENIHR 2008 (Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks), European Commission. THE SAFETY OF MEDICAL DEVICES CONTAINING DEHPPLASTICIZED PVC OR OTHER PLASTICIZERS ON NEONATES AND OTHER GROUPS POSSIBLY AT RISK. 2008.
4. Bourdeaux D, Yessaad M, Chennell P, Larbre V, Eljezi T, Bernard L, et al. Analysis of PVC plasticizers in medical devices and infused solutions by GC–MS. J Pharm Biomed Anal. 25 janv 2016;118:206-13.
5. Bui TT, Giovanoulis G, Cousins AP, Magnér J, Cousins IT, de Wit CA. Human exposure, hazard and risk of alternative plasticizers to phthalate esters. Sci Total Environ. 15 janv 2016;541:451-67.

6. Faouzi MA, Dine T, Gressier B, Kambia K, Luyckx M, Pagniez D, et al. Exposure of hemodialysis patients to di-2-ethylhexyl phthalate. *Int J Pharm.* 25 mars 1999;180(1):113-21.
7. Dine T, Luyckx M, Gressier B, Brunet C, Souhait J, Nogarede S, et al. A pharmacokinetic interpretation of increasing concentrations of DEHP in haemodialysed patients. *Med Eng Phys.* avr 2000;22(3):157-65.
8. Kambia K, Dine T, Azar R, Gressier B, Luyck M, Brunet C. Comparative study of the leachability of di(2-ethylhexyl) phthalate and tri(2-ethylhexyl) trimellitate from haemodialysis tubing. - PubMed - NCBI. 2001.
9. Jacobson MS, Kevy SV, Grand RJ. Effects of a plasticizer leached from polyvinyl chloride on the subhuman primate: a consequence of chronic transfusion therapy. *J Lab Clin Med.* mai 1977;89(5):1066-79.
10. Doull J, Cattley R, Elcombe C, Lake BG, Swenberg J, Wilkinson C, et al. A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. *Regul Toxicol Pharmacol RTP.* juin 1999;29(3):327-57.
11. Mazur HI, Stennett DJ, Egging PK. Extraction of diethylhexylphthalate from total nutrient solution-containing polyvinyl chloride bags. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* févr 1989;13(1):59-62.
12. Loff S, Kabs F, Witt K, Sartoris J, Mandl B, Niessen KH, et al. Polyvinylchloride infusion lines expose infants to large amounts of toxic plasticizers. *J Pediatr Surg.* déc 2000;35(12):1775-81.
13. Kambia K, Dine T, Gressier B, Bah S, Germe A-F, Luyckx M, et al. Evaluation of childhood exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate from perfusion kits during long-term parenteral nutrition. *Int J Pharm.* 27 août 2003;262(1-2):83-91.
14. Pearson SD, Trissel LA. Leaching of diethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride containers by selected drugs and formulation components. *Am J Hosp Pharm.* juill 1993;50(7):1405-9.
15. Butch SH, Knafl P, Oberman HA, Bartlett RH. Blood utilization in adult patients undergoing extracorporeal membrane oxygenated therapy. *Transfusion (Paris).* janv 1996;36(1):61-3.
16. Sampson J, de Korte D. DEHP-plasticised PVC: relevance to blood services. *Transfus Med Oxf Engl.* avr 2011;21(2):73-83.
17. Mettang T, Thomas S, Kiefer T, Fischer FP, Kuhlmann U, Wodarz R, Rettenmeier AW. The fate of leached di(2-ethylhexyl)phthalate in patients undergoing CAPD treatment. - PubMed - NCBI.
18. Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Eckstein R, Weisbach V, Angerer J. Intravenous exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): metabolites of DEHP in urine after a voluntary platelet donation. *Arch Toxicol.* déc 2005;79(12):689-93.
19. Koch HM, Angerer J, Drexler H, Eckstein R, Weisbach V. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) exposure of voluntary plasma and platelet donors. *Int J Hyg Environ Health.* 2005;208(6):489-98.
20. Jaeger RJ, Rubin RJ. Migration of a Phthalate Ester Plasticizer from Polyvinyl Chloride Blood Bags into Stored Human Blood and Its Localization in Human Tissues. *N Engl J Med.* 30 nov 1972;287(22):1114-8.

21. Sasakawa S, Mitomi Y. Di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) Content of Blood or Blood Components Stored in Plastic Bags. *Vox Sang.* 1 févr 1978;34(2):81-6.
22. Haishima Y, Matsuda R, Hayashi Y, Hasegawa C, Yagami T, Tsuchiya T. Risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate released from PVC blood circuits during hemodialysis and pump-oxygenation therapy.
23. Fernandez-Canal C, Pinta PG, Eljezi T, Larbre V, Kauffmann S, Camilleri L, Cosserant B, Bernard L, Pereira B, Constantin JM, Grimandi G, Sautou V; for Armed Study Group. Patients' exposure to PVC plasticizers from ECMO circuits. - PubMed - NCBI.
24. Bernard L, Eljezi T, Clauson H, Lambert C, Bouattour Y, Chennell P, et al. Effects of flow rate on the migration of different plasticizers from PVC infusion medical devices. *PLoS One.* 2018;13(2):e0192369.
25. Faessler D, McCombie G, Biedermann M, Felder F, Subotic U. Leaching of plasticizers from polyvinylchloride perfusion lines by different lipid emulsions for premature infants under clinical conditions. *Int J Pharm.* 30 mars 2017;520(1-2):119-25.
26. Eckert E, Münch F, Göen T, Purbojo A, Müller J, Cesnjevar R. Comparative study on the migration of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and tri-2-ethylhexyl trimellitate (TOTM) into blood from PVC tubing material. 2016.
27. Bernard L. Evaluation de la migration des plastifiants à partir des dispositifs médicaux en polychlorure de vinyle et développement d'un moyen de prévention par procédé Sol-Gel.
28. Bagel S, Dessaigne B, Bourdeaux D, Boyer A, Bouteloup C, Bazin J-E, et al. Influence of lipid type on bis (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) leaching from infusion line sets in parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* nov 2011;35(6):770-5.
29. Rael LT, Bar-Or R, Ambruso DR, Mains CW, Slone DS, Craun ML, et al. Phthalate Esters Used as Plasticizers in Packed Red Blood Cell Storage Bags May Lead to Progressive Toxin Exposure and the Release of Pro-Inflammatory Cytokines. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(3):166-71.
30. Subotic U, Hannmann T, Kiss M, Brade J, Breikopf K, Loff S. Extraction of the plasticizers diethylhexylphthalate and polyadipate from polyvinylchloride nasogastric tubes through gastric juice and feeding solution. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* janv 2007;44(1):71-6.
31. EFSA 2005a. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. *EFSA J.* 1 sept 2005;3(9):243.
32. EFSA 2005b. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Di-isononylphthalate (DINP) for use in food contact materials. *EFSA J.* 1 sept 2005;3(9):244.
33. (NICNAS) National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme. PUBLIC REPORT 1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 1,2-diisononyl ester (Hexamoll DINCH). 2012.
34. Information sur les produits chimiques - ECHA [Internet]. [cité 26 nov 2018]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals>
35. Danish Environmental Protection Agency. Danich EPA 2014. Alternatives to classified phthalates in medical devices.

36. Frank Stuer-Lauridsen, Sonja Mikkelsen, Svend Havelund, Morten Birkved and Lisbet P. Hansen, COWI Consulting Engineers and Planners AS. Environmental and Health Assessment of Alternatives to Phthalates and to flexible PVC [Internet].
37. Gimeno P, Thomas S, Bousquet C, Maggio A-F, Civade C, Brenier C, et al. Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 15 févr 2014;949-950:99-108.
38. Greiner T, Volkmann A, Hildenbrand S, Wodarz R, Perle N, Ziemer G, et al. DEHP and its active metabolites: leaching from different tubing types, impact on proinflammatory cytokines and adhesion molecule expression. Is there a subsumable context? *Perfusion.* 1 janv 2012;27(1):21-9.
39. Dine T, Luyck M, Cazin M, Brunet C, Cazin JC, Goudaliez F. Rapid determination by high performance liquid chromatography of di-2-ethylhexyl phthalate in plasma stored in plastic bags.
40. Ito R, Miura N, Iguchi H, Nakamura H, Ushiro M, Wakui N, et al. Determination of tris(2-ethylhexyl)trimellitate released from PVC tube by LC-MS/MS. *Int J Pharm.* 6 août 2008;360(1-2):91-5.
41. SCENIHR 2015 (Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks), European Commission. The safety of medical devices containing DEHP plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk (2015 update).
42. Bernard L, Cueff R, Breyse C, Décaudin B, Sautou V; Armed Study Group. Migrability of PVC plasticizers from medical devices into a simulant of infused solutions. *Int J Pharm.*
43. Wirnitzer U, Rickenbacher U, Katerkamp A, Schachtrupp A. Systemic toxicity of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHT) in rodents following four weeks of intravenous exposure. *Toxicol Lett.* 10 août 2011;205(1):8-14.
44. Deyo JA. Carcinogenicity and chronic toxicity of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHT) following a 2-year dietary exposure in Fischer 344 rats. *Food Chem Toxicol.* 1 mars 2008;46(3):990-1005.
45. Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. Decrease in Anogenital Distance among Male Infants with Prenatal Phthalate Exposure. *Environ Health Perspect.* août 2005;113(8):1056-61.
46. Engel A, Buhrke T, Imber F, Jessel S, Seidel A, Völkel W, et al. Agonistic and antagonistic effects of phthalates and their urinary metabolites on the steroid hormone receptors ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and AR. *Toxicol Lett.* 5 août 2017;277:54-63.
47. Bornehag C-G, Carlstedt F, Jönsson BAG, Lindh CH, Jensen TK, Bodin A, et al. Prenatal phthalate exposures and anogenital distance in Swedish boys. *Environ Health Perspect.* janv 2015;123(1):101-7.
48. Engel A, Buhrke T, Kasper S, Behr A-C, Braeuning A, Jessel S, et al. The urinary metabolites of DINCH<sup>®</sup> have an impact on the activities of the human nuclear receptors ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . *Toxicol Lett.* 1 mai 2018;287:83-91.

## DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

Actuellement un monde sans plastique semble inimaginable, [195] même si la grande production a commencé tardivement, plus précisément après la seconde guerre mondiale, avec le développement de l'industrie pétrochimique. Environ 8,3 milliards de tonnes de plastique ont été produits entre 1950 et 2015 [195] dont 6,3 milliards (79 %) sont déjà passés à l'état de déchets s'accumulant dans des décharges ou en pleine nature, et plus particulièrement dans les océans. Seulement 9 % de la production de plastique a ainsi pu être recyclée [195]. Compte tenu du risque, la Commission européenne déploie diverses stratégies pour réduire la pollution par les matières plastiques notamment en interdisant ou réduisant les produits de consommation à usage unique (gobelets, assiettes, couverts, pailles, contenants alimentaires, sacs,...).

Malgré l'impact environnemental, le plastique reste aujourd'hui le troisième matériau le plus fabriqué en France, derrière le ciment et l'acier. Les matériaux plastiques les plus utilisés sont le polychlorure de vinyle (PVC), le polyéthylène (PE) et le polypropylène (PP). L'Europe produit environ 5 millions de tonnes de PVC par an [36].

Le PVC est utilisé sous forme rigide par exemple dans la fabrication des fenêtres et flexible dans la fabrication de la tuyauterie, des câbles ou des tubulures des dispositifs médicaux. Pour avoir un PVC flexible, des additifs appelés plastifiants sont ajoutés au polymère. Les propriétés intrinsèques du PVC plastifié (la transparence qui permet la visibilité pendant les administrations des médicaments ou les fluides biologiques) la possibilité de le stériliser et son faible coût [40], font que le PVC plastifié soit très utilisé dans le domaine médical.

La quantité (30 000 tonnes par an) de PVC plastifié utilisé dans le domaine médical reste faible pour l'impact environnemental mais soulève d'autres questions en termes de santé publique. Plusieurs études ont montré que les plastifiants, n'étant pas liés de façon covalente avec la matrice de PVC, peuvent diffuser vers les fluides en contact comme les médicaments perfusés, le sang et l'oxygène [8–13,27,79–82,86], exposant ainsi les patients [8,80,83,88,110,112–117,120–122]. Ces plastifiants, une fois dans l'organisme humain, sont métabolisés en métabolites primaires (par hydrolyse enzymatique) et secondaires (par oxydation) puis éliminer principalement sous forme glucuroconjuguée dans les urines [16,17,19,21,125,140]. Par exemple, le **DEHP** est métabolisé en un composé primaire (**MEHP**) et des composés secondaires (**5-OH-MEHP**, **5-oxo-MEHP**, **5-carboxy-MEHP**). La toxicité du **DEHP** a été particulièrement étudiée, mettant en évidence des effets sur la reproduction et la fertilité de ce composé et ses métabolites. Le métabolite primaire du **DEHP**, le **MEHP**, est 10 fois plus toxique que le **DEHP** [1]. Quant aux métabolites oxydés du **DEHP** ils présentent des effets perturbateurs endocriniens sur les œstrogènes, les androgènes et les hormones thyroïdiennes. Le risque du **DEHP** pour la santé humaine a été clairement établi, d'où son

classement CMR1B selon le Règlement CLP [5]. Dans le domaine des dispositifs médicaux, son usage est restreint par le règlement européen 2017/745 qui limite son utilisation à des teneurs maximales de 0,1% (masse de plastifiant/masse de matière plastifiée) à moins d'en justifier l'intérêt et d'en mentionner la présence sur l'étiquetage du DM [190].

La restriction d'utilisation du **DEHP** dans les DM a nécessité le développement d'alternatives comme le **DINP**, le **DINCH**, le **TOTM**, le **DEHT**, le **TOTM** et l'**ATBC** dont le risque lié à l'exposition *via* les DM a été peu étudié avant leur introduction dans l'industrie biomédicale.

Le projet ARMED® s'est inscrit dans une démarche de sécurisation de l'utilisation des DM en évaluant le risque lié à l'exposition des patients à ces plastifiants alternatifs au **DEHP** (**DEHA**, **DEHT**, **DINCH**, **DINP** et **TOTM**) et à celle de leurs métabolites. Notre travail a contribué à cette démarche à deux niveaux :

- en réalisant la synthèse des métabolites primaires et secondaires des plastifiants alternatifs au **DEHP** tels que le **DEHT**, le **TOTM**, le **DEHA**, le **DINCH** et le **DINP** et en évaluant leur cytotoxicité.
- en évaluant le niveau d'exposition des patients hospitalisés en chirurgie cardiaque aux plastifiants relargués par les DM

La synthèse des métabolites primaires du **DEHT**, du **DEHA**, du **DINP**, du **DINCH** et du **TOTM** à savoir les **MEHT**, **MEHA**, **MINP** et **MMeOP**, **MINCH**, **MeOCH** et **MOTM** a été réalisée (Figure1, étude 1). Les études de métabolisme effectuées par d'autres auteurs [16,17,19,21,125,140] nous a permis de connaître la structure des composés les plus présents dans l'organisme et la possibilité de les synthétiser. L'ensemble des métabolites primaires a été obtenu par estérification des alcools en présence des anhydrides correspondants excepté le **MEHT** qui est développé à partir de l'acide téréphtalique. Les synthèses des métabolites primaires ont été réalisées sans difficultés particulières hormis la synthèse des métabolites primaires du **TOTM** (les **MOTM**). Ce produit a été obtenu en mélange de deux isomères. Malgré plusieurs tentatives pour isoler chacun des isomères purs, nous n'avons pas pu y parvenir dans les conditions de laboratoire. La synthèse du précurseur alcool utilisé dans la synthèse des métabolites primaires du **DINP** et **DINCH** a nécessité plusieurs étapes. Ce dérivé alcool étant très volatil, la voie de synthèse a dû être répétée plusieurs fois afin d'avoir la quantité nécessaire pour réaliser tous les tests. Mais, ce qui est le plus important à noter c'est que tous les métabolites synthétisés possèdent une pureté supérieure à 95% permettant de considérer que les résultats des tests de cytotoxicité reflètent bien la cytotoxicité des métabolites et non celle d'impuretés.

L'étude de cytotoxicité des plastifiants et de leurs métabolites primaires a été effectuée sur des cellules murines L929 selon la norme EN 10993-5 préconisée pour étudier la biocompatibilité des DM. Les plastifiants testés pour cette étude ont été solubilisés dans du DMSO (jusqu'à 1%) en raison de leur caractère hydrophobe qui ne permettait pas de les

utiliser directement dans le milieu de culture cellulaire. La concentration des plastifiants dans le DMSO a été vérifiée par dosage en GC-MS selon la méthode décrite par Bourdeaux et al. [49].

De façon générale, les métabolites primaires des plastifiants s'avèrent plus cytotoxiques que les composés non hydrolysés (**Figure 6 et 7, étude 1**). Le **DINP**, le **DINCH** et le **DEHP** sont cytotoxiques (à 0,1 mg/mL pendant les 7 jours de contact), tandis que leurs métabolites primaires **MINCH**, **MeOCH** et **MINP** sont plus cytotoxiques à la même concentration. Seul le **MMeOP** n'a pas montré de cytotoxicité aux concentrations étudiées de 0,01, 0,05 et 0,1 mg/mL. Le **TOTM** et un de ses métabolites primaires, le **MOTM**, ne sont pas cytotoxiques à ces concentrations. Le **DEHA** et le **DEHT** ne montrent pas de cytotoxicité alors que leur métabolite primaire, le **MEHA** et le **MEHT** sont cytotoxiques (à 0,05 mg/mL). Compte tenu de la demi vie des métabolites primaires du **DINCH** et **DINP** (10-18 h [196], 4 à 8 h, respectivement), la toxicité des métabolites primaires montrée dans notre étude ne doit pas être négligée particulièrement dans le cas des circulations extracorporelles au cours desquelles les métabolites primaires sont produits dès contact entre le sang du patient et les lignes des circuits. En même temps il ne faut pas oublier que notre test de toxicité reste une simple étude de cytotoxicité sur cellules murines, donc peu spécifique. En perspective, l'étude de cytotoxicité des métabolites primaires sur les cellules sanguines humaines sera nécessaire. L'ensemble des métabolites primaires du **TOTM** (les 3 **MOTM** et les 3 **DOTM**) ainsi et que métabolite primaire de l'**ATBC** devraient être synthétisés afin de pouvoir tester leur cytotoxicité.

Concernant la synthèse des métabolites secondaires du **DINCH** et du **DINP**, nous avons repris la méthode développée par Nüti et al [197], à savoir l'oxydation d'une fonction vinyle terminale (**Schéma 1 et 2 ; étude 2**). Les 5 premières étapes (11 au totale) permettent d'obtenir le précurseur vinyle (permettant d'obtenir les métabolites secondaires) ont été répétées plusieurs fois afin d'obtenir les quantités nécessaires pour réaliser tous les tests. Les métabolites hydroxylés et carboxylés du **DINP**, du **DINCH** et du **DEHP** n'ont montré aucune cytotoxicité jusqu'à des concentrations de 0,1 mg/mL, de même que le **7-oxo-MMeOP**, autre métabolite oxydé du **DINP**. Le **5-oxo-MEHP**, métabolite du **DEHP** et le **7-oxo-MMeOCH**, métabolite du **DINCH** se sont révélés cytotoxiques à 0,1 mg/mL. Les concentrations testées dans notre étude ont été choisies sur la base d'une transformation complète des plastifiants relargués après contact direct entre un DM et le sang du patient [4,14,20,198]. Les données recueillies dans la littérature scientifique mettent en évidence que les métabolites secondaires, issus du métabolisme hépatique du métabolite primaire du plastifiant (provenant lui-même d'une hydrolyse enzymatique du plastifiant) sont présents à des concentrations nettement inférieures dans les liquides biologiques. Les études de biomonitoring menées chez l'homme [73] [17] après l'introduction du **DINCH** et du **DINP** sur le marché montrent que les concentrations de leurs métabolites secondaires dans les

échantillons urinaires sont de l'ordre de 0,33-16,4 µg/L, soit environ 100 à 1000 fois inférieur aux concentrations révélées toxiques dans notre étude. Les métabolites secondaires du **DEHP** trouvés dans l'urine des humains exposés pendant deux décades sont également de l'ordre de 16,7 à 21,0 µg/L [17,95]. Nous pouvons considérer que les métabolites secondaires ne présentent pas de risques de cytotoxicité aux doses retrouvées dans l'organisme. Ces informations, associées aux données de toxicité obtenues chez l'animal restent rassurantes vis-à-vis de l'utilisation de DM plastifié avec du **DINCH** ou du **DINP**. Mais dans le cas d'un contact direct entre les DM en PVC plastifié et le sang du patient (CEC en chirurgie cardiaque, dialyse), le risque est différent car les concentrations en métabolites primaires retrouvées dans le sang des patients au contact direct des lignes de CEC peuvent atteindre les valeurs cytotoxiques mises en évidence dans notre étude.

Par ailleurs ces études de toxicité ne prennent pas en considération le risque d'effet perturbateur endocrinien des molécules qui peut suivre des courbes non monotones et être présent à très faibles doses. Si les effets perturbateurs endocriniens du **DEHP** ont été démontrés [23], limitant son utilisation à un taux de 0,1% dans les DM [190], ceux des plastifiants alternatifs n'ont pas encore été clairement mis en évidence. Quelques études récentes montrent un profil douteux qui soulève des inquiétudes concernant le potentiel de perturbation endocrinienne du **DINP** et du **DINCH** chez l'homme [25,26]. Kambia et al ont montré que le **5-OH MEHT** entraînait une co-stimulation des récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes chez l'humain ainsi qu'une augmentation de la synthèse des œstrogènes [191]. Jusqu'à présent il n'y a pas d'étude sur les effets perturbateurs endocriniens des autres plastifiants alternatifs (**TOTM**, **DEHA** ou **ATBC**) et de leurs métabolites.

Ces études restent donc à mettre en œuvre à partir des différents métabolites dès lors que leur synthèse sera réalisée.

Après les études de toxicité nous nous sommes intéressés à l'aspect clinique, à savoir l'exposition à ces plastifiants de patients pour lesquels sont utilisés de nombreux DM en PVC, à savoir des patients hospitalisés en CCV. Ainsi nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- Quels sont les plastifiants présents dans les DM de CCV en PC et en quelle quantité ?
- Quelle quantité de plastifiant est relarguée par ces DM lors de leur utilisation dans la prise en charge des patients en CCV ?
- Quelles sont les doses d'exposition des patients concernés ?
- Y-a-t-il un risque pour le patient suite à ces expositions ?

Plusieurs études réalisées sur la migration des plastifiants calculent la quantité des plastifiants relarguée et susceptible d'exposer les patients [8–13,27,79–82,86]. Mais elles ne reflètent pas une situation clinique réelle et ne permettent pas d'évaluer l'exposition des patients aux

différents plastifiants du PVC par chacun des actes médicaux lors de multi-expositions (circulation extracorporelle, perfusion, nutrition,...).

A cet effet, une étude clinique a été menée au CHU de Clermont-Ferrand, sur 66 patients hospitalisés en CCV. Le recensement des DM utilisés, le dosage des plastifiants dans les différents DM par GC-MS, et l'évaluation de la dose d'exposition *via* un modèle mathématique ont été réalisées. Pendant leur hospitalisation en CCV les patients ont subi plusieurs prises en charges thérapeutiques les exposant à différents DM et donc à divers plastifiants. Plus de 90% des patients ont, le premier jour de l'étude au bloc opératoire, une circulation extracorporelle. Ensuite, ils ont pu bénéficier d'autres actes médicaux comme la nutrition parentérale ou entérale, des transfusions ou des perfusions de médicaments. Quelques rares patients ont fait l'objet de prises en charges plus spécifiques comme la plasmaphérèse, l'ECMO ou ECLS. Nous avons estimé l'exposition aux plastifiants ou la dose d'exposition journalière (AJ ou DI en anglais) reçue par ces patients en fonction des différentes prises en charge.

L'analyse des plastifiants au sein des DM de CCV recensés sont plastifiés principalement au **DEHP** (62%) notamment les DM de CEC et d'oxygénothérapie. Les autres plastifiants sont présents dans différentes catégories de DM : le **DINP**, le **DINCH** et le **TOTM** sont notamment retrouvés dans les DM de l'apport parentéral destinés à la perfusion de médicaments ou de nutrition. Le **DINCH** est le seul plastifiant identifié dans les DM de nutrition entérale. A noter que le **DEHT**, est un contaminant très souvent retrouvé dans les DM, notamment ceux plastifiés au **TOTM**. On le retrouve en tant que plastifiant majoritaire, donc volontairement ajouté, dans la composition de DM d'oxygénothérapie. Le **DEHA** et l'**ATBC** ne sont utilisés que très ponctuellement, nous les avons retrouvés uniquement dans 4 DM.

Les doses d'exposition (mg / j) aux différents plastifiants ont été estimées pour chaque patient avec un modèle mathématique établi d'après la loi de Fick. Concernant l'apport journalier en **DEHP** *via* les DM, il est particulièrement élevé lors du premier jour de suivi des patients. Ceci est lié à l'exposition *via* les DM de CEC, acte médical réalisé chez plus de 90% des patients opérés le premier jour. De plus, les lignes de CEC présentent une grande surface de contact avec le sang du patient, et ce sang circulent pendant plusieurs heures au contact du PVC. Ceci expose les patients à de grande quantité de **DEHP**. D'ailleurs, les experts du SCENIHR [4] ont classé, dès 2008, la CEC comme acte médical à haut risque d'exposition au **DEHP**. L'exposition journalière des patients aux plastifiants **DINP** et **DINCH** est également élevée. Les expositions à ces plastifiants proviennent notamment de la nutrition parentérale et entérale. Quant au **TOTM**, ses doses d'expositions sont faibles en raison de ses propriétés physico chimiques lui permettant de limiter sa diffusion du PVC vers les médicaments perfusés ou le sang du patient pour les DM de CEC. L'exposition au **DEHT** reste très modérée dans le cadre de notre étude car ce plastifiant est essentiellement présent à l'état de traces dans les DM, et encore peu utilisé comme plastifiant alternatif au **DEHP**. Il présente pourtant un intérêt du fait de sa faible diffusion du PVC vers les fluides en contact et son profil toxicologique intéressant. Quant au

**DEHA** et à l'**ATBC**, leur faible utilisation dans les DM de CCV ne nous permet pas d'évaluer leur réel impact sur l'exposition des patients.

Afin d'évaluer le risque d'exposition des patients aux plastifiants, les doses d'exposition (AJ) estimées ont été comparées aux valeurs toxicologiques de références à savoir les doses journalières tolérables ou DJT [45].

La dose d'exposition des patients au **DEHP** provenant des DM de CEC, de transfusion et d'oxygénothérapie dépasse très largement la DJT du plastifiant. Le **DEHP** peut ainsi exposer à des risques pour la santé humaine vu son classement comme CMR 1B [5] et comme perturbateur endocrinien [23]. Les doses d'exposition au **DINP** et au **DINCH** dépassent également les DJT *via* l'utilisation des DM destinés à la nutrition entérale et parentérale ainsi qu'à la perfusion. Au regard des résultats obtenus, le **DINCH** et le **DINP** ne s'inscrivent pas comme les plastifiants les plus intéressants pour remplacer le **DEHP**. Le **TOTM**, retrouvé dans de nombreux DM de nutrition parentérale, en CEC, présente des doses d'exposition très faibles et bien en deçà de sa DJT. Il représente donc une alternative au **DEHP** particulièrement intéressante. Il reste cependant à étudier la toxicité des métabolites primaires (différents isomères du **MOTM** et du **DOTM**) sur les cellules sanguines pour les DM de CEC ainsi que les effets perturbateurs endocriniens du plastifiant et de l'ensemble de ses métabolites, primaires et secondaires. Quant au **DEHT**, sa faible utilisation comme plastifiant majoritaire dans les DM de CCV permet difficilement d'estimer l'exposition réelle des patients *via* les DM. Sa diffusion très modérée à partir du PVC et son profil cytotoxique en font un plastifiant d'intérêt pour les DM. Les données récentes montrant un effet perturbateur endocrinien d'un de ses métabolites oxydés, le **5-OH MEHT**, ne semble pas poser de problème particulier pour des patients adultes de CCV dans le cadre d'une hospitalisation de courte durée. Par contre, se pose la question de l'utilisation de DM plastifiés au **DEHT** chez la femme enceinte et le nouveau-né prématuré.

En conclusion, notre étude permet de mettre en évidence les niveaux d'exposition des patients de CCV aux différents plastifiants du PVC *via* l'utilisation de DM. L'exposition au **DEHP** est encore très présente et devra être réduite par l'utilisation de plastifiants alternatifs. Cependant certains d'entre eux comme le **DINCH** et le **DINP** exposent déjà les patients à des doses potentiellement toxiques en raison de leur diffusion importante à partir des DM. Par ailleurs nos travaux ont démontré une cytotoxicité de plusieurs métabolites de ces deux composés. La détermination des taux urinaires de ces métabolites chez les patients exposés permettra de voir si les risques toxicologiques sont confirmés. L'analyse des taux urinaires des métabolites du **DEHT** devrait également permettre d'évaluer si les concentrations en **5-OH-MEHT** ayant montré un effet sur les récepteurs aux œstrogènes et androgènes, et sur la synthèse stéroïdienne sont atteintes. Concernant le **TOTM**, l'analyse des taux urinaires des différents métabolites permettra d'avoir une vision complète de l'exposition des patients. Cependant, dans l'immédiat il sera difficile de corréliser ces taux avec un potentiel risque

toxicologique puisque les études de cytotoxicité des métabolites secondaires et d'une partie des métabolites primaires du **TOTM** n'ont pas été réalisées. Par ailleurs nous ne disposons à ce jour d'aucune donnée sur l'effet perturbateur endocrinien du plastifiant et de ses différents métabolites.

Des travaux restent encore à réaliser sur les plastifiants alternatifs au **DEHP** pour attester d'une absence de risque sanitaire lors d'une utilisation dans les différents dispositifs médicaux.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Huber WW, Grasl-Kraupp B, Schulte-Hermann R. Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. *Crit Rev Toxicol* 1996;26:365–481. <https://doi.org/10.3109/10408449609048302>.
- [2] Frederiksen H, Skakkebaek NE, Andersson A-M. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:899–911. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600243>.
- [3] Silva MJ, Samandar E, Preau Jr. JL, Needham LL, Calafat AM. Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology* 2006;219:22–32. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.10.018>.
- [4] SCENIHR 2015 (Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks), European Commission. The safety of medical devices containing DEHPplasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk (2015 update). n.d.
- [5] LE PARLEMENT EUROPÉEN ET LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE. Règlement CLP 1272/2008/ce relatif à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges - 1272-2008-clp.pdf. n.d.
- [6] LE PARLEMENT EUROPÉEN ET LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE. 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) no 178/ 2002 et le règlement (CE) no 1223/ 2009 et abrogeant les directives du Conseil 90/ 385/ CEE et 93/ 42/ CEE - 05042017. n.d.
- [7] SCENIHR 2008 (Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks), European Commission. THE SAFETY OF MEDICAL DEVICES CONTAINING DEHPPLASTICIZED PVC OR OTHER PLASTICIZERS ON NEONATES AND OTHER GROUPS POSSIBLY AT RISK. 2008. n.d.
- [8] Jaeger RJ, Rubin RJ. Migration of a Phthalate Ester Plasticizer from Polyvinyl Chloride Blood Bags into Stored Human Blood and Its Localization in Human Tissues. *New England Journal of Medicine* 1972;287:1114–8. <https://doi.org/10.1056/NEJM197211302872203>.
- [9] Sasakawa S, Mitomi Y. Di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) Content of Blood or Blood Components Stored in Plastic Bags. *Vox Sanguinis* 1978;34:81–6. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1978.tb03727.x>.

- [10] Dine T, Luyck M, Cazin M, Brunet C, Cazin JC, Goudaliez F. Rapid determination by high performance liquid chromatography of di-2-ethylhexyl phthalate in plasma stored in plastic bags. 1991. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1868266> (accessed November 22, 2018).
- [11] Ito R, Miura N, Iguchi H, Nakamura H, Ushiro M, Wakui N, et al. Determination of tris(2-ethylhexyl)trimellitate released from PVC tube by LC-MS/MS. *Int J Pharm* 2008;360:91–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.020>.
- [12] Bagel S, Dessaigne B, Bourdeaux D, Boyer A, Bouteloup C, Bazin J-E, et al. Influence of lipid type on bis (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) leaching from infusion line sets in parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2011;35:770–5. <https://doi.org/10.1177/0148607111414021>.
- [13] Greiner T, Volkman A, Hildenbrand S, Wodarz R, Perle N, Ziemer G, et al. DEHP and its active metabolites: leaching from different tubing types, impact on proinflammatory cytokines and adhesion molecule expression. Is there a subsumable context? *Perfusion* 2012;27:21–9. <https://doi.org/10.1177/0267659111419990>.
- [14] Kambia K, Dine T, Gressier B, Dupin-Spriet T, Luyckx M, Brunet C. Evaluation of the direct toxicity of trioctyltrimellitate (TOTM), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and their hydrolysis products on isolated rat hepatocytes. *Int J Artif Organs* 2004;27:971–8.
- [15] Silva MJ, Samandar E, Calafat AM, Ye X. Identification of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHTP) metabolites using human liver microsomes for biomonitoring applications. *Toxicol In Vitro* 2015;29:716–21. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.002>.
- [16] Silva MJ, Samandar E, Ye X, Calafat AM. In Vitro Metabolites of Di-2-ethylhexyl Adipate (DEHA) as Biomarkers of Exposure in Human Biomonitoring Applications. *Chem Res Toxicol* 2013;26:1498–502. <https://doi.org/10.1021/tx400215z>.
- [17] Koch HM, Müller J, Angerer J. Determination of secondary, oxidised di-isononylphthalate (DINP) metabolites in human urine representative for the exposure to commercial DINP plasticizers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;847:114–25. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.044>.
- [18] Silva MJ, Reidy JA, Preau JL, Needham LL, Calafat AM. Oxidative Metabolites of Diisononyl Phthalate as Biomarkers for Human Exposure Assessment. *Environ Health Perspect* 2006;114:1158–61. <https://doi.org/10.1289/ehp.8865>.
- [19] Koch HM, Schütze A, Pälme C, Angerer J, Brüning T. Metabolism of the plasticizer and phthalate substitute diisononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH®) in humans after single oral doses. *Arch Toxicol* 2013;87:799–806. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0990-4>.
- [20] Eckert E, Müller J, Göen T. Simultaneous determination of polyvinylchloride plasticizers di(2-ethylhexyl) phthalate and tri(2-ethylhexyl) trimellitate and its degradation products in blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2015;1410:173–80. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.083>.
- [21] Höllerer C, Göen T, Eckert E. Comprehensive monitoring of specific metabolites of tri-(2-ethylhexyl) trimellitate (TEHTM) in urine by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2018;410:4343–57. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1086-7>.
- [22] Sharpe RM, Irvine DS. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* 2004;328:447–51.

- [23] Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. Decrease in Anogenital Distance among Male Infants with Prenatal Phthalate Exposure. *Environ Health Perspect* 2005;113:1056–61. <https://doi.org/10.1289/ehp.8100>.
- [24] Bornehag C-G, Carlstedt F, Jönsson BAG, Lindh CH, Jensen TK, Bodin A, et al. Prenatal phthalate exposures and anogenital distance in Swedish boys. *Environ Health Perspect* 2015;123:101–7. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408163>.
- [25] Engel A, Buhrke T, Imber F, Jessel S, Seidel A, Völkel W, et al. Agonistic and antagonistic effects of phthalates and their urinary metabolites on the steroid hormone receptors ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and AR. *Toxicology Letters* 2017;277:54–63. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.028>.
- [26] Engel A, Buhrke T, Kasper S, Behr A-C, Braeuning A, Jessel S, et al. The urinary metabolites of DINCH<sup>®</sup> have an impact on the activities of the human nuclear receptors ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . *Toxicol Lett* 2018;287:83–91. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.02.006>.
- [27] Bernard L, Cueff R, Breyse C, Décaudin B, Sautou V; Armed Study Group. Migrability of PVC plasticizers from medical devices into a simulant of infused solutions. *Int J Pharm* 2015.
- [28] Plastics Europe, Association of Plastics Manufacturers. *Plastics\_the\_facts\_2017*. An analysis of European plastics production, demand and waste data. n.d. [https://www.plasticseurope.org/application/files/5715/1717/4180/Plastics\\_the\\_facts\\_2017\\_FINAL\\_for\\_website\\_one\\_page.pdf](https://www.plasticseurope.org/application/files/5715/1717/4180/Plastics_the_facts_2017_FINAL_for_website_one_page.pdf) (accessed November 12, 2018).
- [29] Graedel TE, Harper EM, Nassar NT, Reck BK. On the materials basis of modern society. *PNAS* 2015;112:6295–300. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312752110>.
- [30] Fauner G, Endlich W. *Manuel des techniques de collage*. Paris, France: Soproge; 1984.
- [31] Thompson RC, Moore CJ, vom Saal FS, Swan SH. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364:2153–66. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0053>.
- [32] Polychlorure de vinyle - Société Chimique de France n.d. <http://www.societechimiquedefrance.fr/polychlorure-de-vinyle.html> (accessed November 15, 2018).
- [33] POLYMEREXPERT. Polymer Expert - Innovation - Synthèse - R&D du Polymer. POLYMEREXPERT n.d. <https://www.polymerexpert.fr/> (accessed November 15, 2018).
- [34] George Wypych. *PVC Degradation & Stabilization*. 3rd Edition. Toronto: 2015.
- [35] Plastics Europe n.d. <https://www.plasticseurope.org/en> (accessed November 15, 2018).
- [36] Découvrir le PVC. n.d. <http://www.decouvrirlepvc.org/> (accessed November 12, 2018).
- [37] [www.techniques-ingenieur.fr](http://www.techniques-ingenieur.fr). Adjuvants des plastiques. *Plastiques et composites*, vol. 2e édition, n.d.
- [38] Saeki Y, Emura T. Technical progresses for PVC production. *Progress in Polymer Science* 2002;27:2055–131. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(02\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(02)00039-4).
- [39] Zhao X, Courtney JM. *Update on medical plasticised PVC*. Shawbury: iSmithers; 2009.
- [40] Schiller M. *PVC additives: performance, chemistry, developments, and sustainability*. München: Hanser; 2015.
- [41] Wypych G, editor. *Handbook of plasticizers*. 3rd Edition. Toronto: ChemTec Publishing; 2017.

- [42] George Wypych. Handbook of Plasticizers - 3rd Edition 2017. <https://www.elsevier.com/books/handbook-of-plasticizers/wypych/978-1-895198-97-3> (accessed April 27, 2019).
- [43] Steve Cullen Business Director, Plasticizers Eastman Chemical Company. Global Plasticizer Update SPI Flexible Vinyl Products 2012.
- [44] INFO CHIMIE. Les plastifiants cherchent à redorer leur image 2017. /les-plastifiants-cherchent-a-redorer-leur-image,86951 (accessed November 16, 2018).
- [45] Bui TT, Giovanoulis G, Cousins AP, Magnér J, Cousins IT, de Wit CA. Human exposure, hazard and risk of alternative plasticizers to phthalate esters. *Science of The Total Environment* 2016;541:451–67. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.036>.
- [46] Plasticisers in medical applications - PVC n.d.
- [47] Miller WJ, McCullough J, Balfour HH, Haake RJ, Ramsay NK, Goldman A, et al. Prevention of cytomegalovirus infection following bone marrow transplantation: a randomized trial of blood product screening. *Bone Marrow Transplant* 1991;7:227–34.
- [48] ANSM. Contrôle du marché des dispositifs médicaux en PVC annoncés sans DEHP. 2016.
- [49] Bourdeaux D, Yessaad M, Chennell P, Larbre V, Eljezi T, Bernard L, et al. Analysis of PVC plasticizers in medical devices and infused solutions by GC–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2016;118:206–13. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.034>.
- [50] Kastner J, Cooper DG, Marić M, Dodd P, Yargeau V. Aqueous leaching of di-2-ethylhexyl phthalate and “green” plasticizers from poly(vinyl chloride). *Sci Total Environ* 2012;432:357–64. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.014>.
- [51] The PubChem Project n.d.
- [52] PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL. RÈGLEMENT (CE) No 1907/2006 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 18 décembre 2006. 2006.
- [53] mohammed.berrada. Comment fonctionne l’extrusion du plastique ? mohammed.berrada n.d. <http://mohammed.berrada.over-blog.com/article-comment-fonctionne-l-extrusion-plastique-guide-pratique-86186757.html> (accessed November 20, 2018).
- [54] plasturgiejp.free.fr. L’extrusion des thermoplastiques. PRESENTATION DU PROCEDE. n.d.
- [55] ANSM. Dispositifs médicaux utilisés en néonatalogie et pédiatrie et stérilisés à l’oxyde d’éthylène. Mise en oeuvre de la norme NF EN ISO 10993-7. Octobre 2015. ANSM; 2015.
- [56] Genay S, Feutry F, Masse M, Barthélémy C, Sautou V, Odou P, et al. Identification and quantification by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of seven plasticizers in PVC medical devices. *Anal Bioanal Chem* 2017;409:1271–80. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0053-4>.
- [57] Bernard L, Bourdeaux D, Pereira B, Azaroual N, Barthélémy C, Breyse C, et al. Analysis of plasticizers in PVC medical devices: Performance comparison of eight analytical methods. *Talanta* 2017;162:604–11. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.033>.
- [58] Saeki K, Funatsu K, Tanabe K. Discrimination of poly(vinyl chloride) samples with different plasticizers and prediction of plasticizer contents in poly(vinyl chloride) using near-infrared spectroscopy and neural-network analysis. *Anal Sci* 2003;19:309–12.

- [59] Zygoura PD, Riganakos KA, Kontominas MG. Study of the migration behavior of acetyl tributyl citrate from PVDC/PVC film into fish fillets as affected by intermediate doses of electron beam radiation. *Eur Food Res Technol* 2011;232:1017–25. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1475-z>.
- [60] Goulas AE, Zygoura P, Karatapanis A, Georgantelis D, Kontominas MG. Migration of di(2-ethylhexyl) adipate and acetyltributyl citrate plasticizers from food-grade PVC film into sweetened sesame paste (halawa tehineh): kinetic and penetration study. *Food Chem Toxicol* 2007;45:585–91. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.10.003>.
- [61] Farajzadeh MA, Khorram P, Nabil AAA. Solid-based disperser liquid-liquid microextraction for the preconcentration of phthalate esters and di-(2-ethylhexyl) adipate followed by gas chromatography with flame ionization detection or mass spectrometry. *J Sep Sci* 2014;37:1177–84. <https://doi.org/10.1002/jssc.201301306>.
- [62] Amberg-Müller JP, Hauri U, Schlegel U, Hohl C, Brüscheweiler BJ. Migration of phthalates from soft PVC packaging into shower and bath gels and assessment of consumer risk. *J Verbr Lebensm* 2010;5:429–42. <https://doi.org/10.1007/s00003-010-0620-0>.
- [63] Bueno-Ferrer C, Jiménez A, Garrigós MC. Migration analysis of epoxidized soybean oil and other plasticizers in commercial lids for food packaging by gas chromatography–mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2010;27:1469–77. <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.502129>.
- [64] Sulentic RO, Dumitrascu I, Deziel NC, Gurzau AE. Phthalate Exposure from Drinking Water in Romanian Adolescents. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102109>.
- [65] H. Fromme, T. Lahrz, M. Piloty, H. Gebhart, A. Oddoy, H. Rüden, et al. Occurrence of phthalates and musk fragrances in indoor air and dust from apartments and kindergartens in Berlin (Germany) 2004.
- [66] Boor BE, Liang Y, Crain NE, Järnström H, Novoselac A, Xu Y. Identification of Phthalate and Alternative Plasticizers, Flame Retardants, and Unreacted Isocyanates in Infant Crib Mattress Covers and Foam. *Environ Sci Technol Lett* 2015;2:89–94. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00039>.
- [67] Biedermann-Brem S, Biedermann M, Pfenninger S, Bauer M, Altkofer W, Rieger K, et al. Plasticizers in PVC Toys and Childcare Products: What Succeeds the Phthalates? Market Survey 2007. *Chroma* 2008;68:227–34. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0672-9>.
- [68] Gimeno P, Thomas S, Bousquet C, Maggio A-F, Civade C, Brenier C, et al. Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014;949–950:99–108. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.037>.
- [69] Radaniel T, Genay S, Simon N, Feutry F, Quagliozi F, Barthélémy C, et al. Quantification of five plasticizers used in PVC tubing through high performance liquid chromatographic-UV detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014;965:158–63. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.06.027>.
- [70] Lecoeur M, Simon N, Sautou V, Decaudin B, Vaccher C, ARMED study group. A chemometric approach to elucidate the parameter impact in the hyphenation of evaporative light scattering detector to supercritical fluid chromatography. *J Chromatogr A* 2014;1333:124–33. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.054>.

- [71] Lecoeur M, Decaudin B, Guillotin Y, Sautou V, Vaccher C, ARMED Study Group. Comparison of high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography using evaporative light scattering detection for the determination of plasticizers in medical devices. *J Chromatogr A* 2015;1417:104–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.026>.
- [72] Schütze A, Pälme C, Angerer J, Weiss T, Brüning T, Koch HM. Quantification of biomarkers of environmental exposure to di(isononyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) in urine via HPLC–MS/MS. *Journal of Chromatography B* 2012;895–896:123–30. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.030>.
- [73] Schütze A, Kolossa-Gehring M, Apel P, Brüning T, Koch HM. Entering markets and bodies: increasing levels of the novel plasticizer Hexamoll® DINCH® in 24 h urine samples from the German Environmental Specimen Bank. *Int J Hyg Environ Health* 2014;217:421–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.08.004>.
- [74] Silva MJ, Jia T, Samandar E, Preau Jr. JL, Calafat AM. Environmental exposure to the plasticizer 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid, diisononyl ester (DINCH) in US adults (2000–2012). *Environmental Research* 2013;126:159–63. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.05.007>.
- [75] Bernard L, Décaudin B, Lecoeur M, Richard D, Bourdeaux D, Cuff R, et al. Analytical methods for the determination of DEHP plasticizer alternatives present in medical devices: a review. *Talanta* 2014;129:39–54. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.04.069>.
- [76] Bernard L, Cuff R, Bourdeaux D, Breyse C, Sautou V; Armed Study Group. Analysis of plasticizers in poly(vinyl chloride) medical devices for infusion and artificial nutrition: comparison and optimization of the extraction procedures, a pre-migration test step. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(6):1651–9.
- [77] Zhou LY, Ashraf-Khorassani M, Taylor LT. Comparison of methods for quantitative analysis of additives in low-density polyethylene using supercritical fluid and enhanced solvent extraction. *Journal of Chromatography A* 1999;858:209–18. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00729-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00729-3).
- [78] Cano JM, Marín ML, Sánchez A, Hernandis V. Determination of adipate plasticizers in poly(vinyl chloride) by microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* 2002;963:401–9. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00642-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00642-8).
- [79] Bernard L, Eljezi T, Clauson H, Lambert C, Bouattour Y, Chennell P, Pereira B, Sautou V; ARMED Study Group. Effects of flow rate on the migration of different plasticizers from PVC infusion medical devices. - PubMed - NCBI 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29474357> (accessed November 22, 2018).
- [80] Fernandez-Canal C, Pinta PG, Eljezi T, Larbre V, Kauffmann S, Camilleri L, Cosserant B, Bernard L, Pereira B, Constantin JM, Grimandi G, Sautou V; for Armed Study Group. Patients' exposure to PVC plasticizers from ECMO circuits. - PubMed - NCBI n.d.
- [81] Eckert E, Münch F, Göen T, Purbojo A, Müller J, Cesnjevar R. Comparative study on the migration of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and tri-2-ethylhexyl trimellitate (TOTM) into blood from PVC tubing material. 2016.
- [82] Haishima Y, Matsuda R, Hayashi Y, Hasegawa C, Yagami T, Tsuchiya T. Risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate released from PVC blood circuits during hemodialysis and

- pump-oxygenation therapy. 2004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15072788> (accessed November 22, 2018).
- [83] Kambia K, Dine T, Azar R, Gressier B, Luyck M, Brunet C. Comparative study of the leachability of di(2-ethylhexyl) phthalate and tri(2-ethylhexyl) trimellitate from haemodialysis tubing. - PubMed - NCBI 2001.
- [84] Al Salloum H, Saunier J, Tfayli A, Yagoubi N. Studying DEHP migration in plasticized PVC used for blood bags by coupling Raman confocal microscopy to UV spectroscopy. 2016.
- [85] LA, COMMI, SSION, E, UROPÉENNE. l'Union européen, ne. Règlement (UE) no 10/2011 de la Commission du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires. n.d.
- [86] Rael LT, Bar-Or R, Ambruso DR, Mains CW, Slone DS, Craun ML, et al. Phthalate Esters Used as Plasticizers in Packed Red Blood Cell Storage Bags May Lead to Progressive Toxin Exposure and the Release of Pro-Inflammatory Cytokines. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009;2:166–71. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.3.8608>.
- [87] Faessler D, McCombie G, Biedermann M, Felder F, Subotic U. Leaching of plasticizers from polyvinylchloride perfusion lines by different lipid emulsions for premature infants under clinical conditions. *Int J Pharm* 2017;520:119–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.046>.
- [88] Bernard L, Eljezi T, Clauson H, Lambert C, Bouattour Y, Chennell P, et al. Effects of flow rate on the migration of different plasticizers from PVC infusion medical devices. *PLoS ONE* 2018;13:e0192369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192369>.
- [89] Kambia K, Dine T, Gressier B, Bah S, Germe A-F, Luyckx M, et al. Evaluation of childhood exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate from perfusion kits during long-term parenteral nutrition. *Int J Pharm* 2003;262:83–91.
- [90] Subotic U, Hannmann T, Kiss M, Brade J, Breitkopf K, Loff S. Extraction of the plasticizers diethylhexylphthalate and polyadipate from polyvinylchloride nasogastric tubes through gastric juice and feeding solution. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:71–6. <https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000237939.50791.4b>.
- [91] Vitrac et Joly, 2008. Laboratoire national de métrologie et d'essais. Phénomène de transferts de matières n.d. <http://www.contactalimentaire.com/index.php?id=682> (accessed November 23, 2018).
- [92] Seyed Mohamad Ali EBRAHIMZADEH MO USA VI SC de la DIN-B. Migration de molécules volatiles dans un système alimentemballage bois : Modélisation des transferts et mesure des coefficients de diffusion. 1998.
- [93] Jean Philibert. Phénomènes de transfert, 10 Transfert de Masse, Diffusion et Transport. Diffusion et transport de matière dans les solides, n.d.
- [94] Bernard L, Cueff R, Chagnon M, Abdoulouhab F, Décaudin B, Breyse C, et al. Migration of plasticizers from PVC medical devices: Development of an infusion model. *Int J Pharm* 2015;494:136–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.033>.
- [95] Wittasek M, Wiesmüller GA, Koch HM, Eckard R, Dobler L, Müller J, et al. Internal phthalate exposure over the last two decades--a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:319–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.01.037>.

- [96] (NICNAS) National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme. PUBLIC REPORT 1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 1,2-diisononyl ester (Hexamoll DINCH). 2012. 2012.
- [97] Frank Stuer-Lauridsen, Sonja Mikkelsen, Svend Havelund, Morten Birkved and Lisbet P. Hansen, COWI Consulting Engineers and Planners AS. Environmental and Health Assesment of Alternatives to Phthalates and to flexible PVC. 2001.
- [98] DIRECTIVES DE QUALITÉ POUR L'EAU DE BOISSON. Organisation mondiale de la Santé 2017. n.d.
- [99] EFSA 2005a. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. EFSA Journal 2005;3:243. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.243>.
- [100] EFSA 2005b. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Di-isononylphthalate (DINP) for use in food contact materials. EFSA Journal 2005;3:244. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.244>.
- [101] Information sur les produits chimiques - ECHA n.d. <https://echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals> (accessed November 26, 2018).
- [102] Danish Environmental Protection Agency. Danich EPA 2014. Alternatives to classified phthalates in medical devices. 2014.
- [103] Hines CJ, Hopf NBN, Deddens JA, Silva MJ, Calafat AM. Estimated daily intake of phthalates in occupationally exposed groups. J Expo Sci Environ Epidemiol 2011;21:133–41. <https://doi.org/10.1038/jes.2009.62>.
- [104] Sathyanarayana S, Karr CJ, Lozano P, Brown E, Calafat AM, Liu F, et al. Baby care products: possible sources of infant phthalate exposure. Pediatrics 2008;121:e260-268. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-3766>.
- [105] Enke U, Schleussner E, Pälme C, Seyfarth L, Koch HM. Phthalate exposure in pregnant women and newborns - the urinary metabolite excretion pattern differs distinctly. Int J Hyg Environ Health 2013;216:735–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.01.006>.
- [106] Calafat AM, Slakman AR, Silva MJ, Herbert AR, Needham LL. Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2004;805:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.006>.
- [107] <http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/?sequence=45>. Exposition des populations. 33, n.d., p. 347–65.
- [108] Michael A. Babich et al. Risk assessment of oral exposure to diisononyl phthalate from childrens products. n.d.
- [109] Tsumura Y, Ishimitsu S, Kaihara A, Yoshii K, Tonogai Y. Phthalates, Adipates, Citrate and Some of the Other Plasticizers Detected in Japanese Retail Foods: a Survey. JOURNAL OF HEALTH SCIENCE 2002;48:493–502. <https://doi.org/10.1248/jhs.48.493>.
- [110] Faouzi MA, Dine T, Gressier B, Kambia K, Luyckx M, Pagniez D, et al. Exposure of hemodialysis patients to di-2-ethylhexyl phthalate. Int J Pharm 1999;180:113–21.

- [111] Dine T, Luyckx M, Gressier B, Brunet C, Souhait J, Nogarede S, et al. A pharmacokinetic interpretation of increasing concentrations of DEHP in haemodialysed patients. *Med Eng Phys* 2000;22:157–65.
- [112] Mettang T, Thomas S, Kiefer T, Fischer FP, Kuhlmann U, Wodarz R, Rettenmeier AW. The fate of leached di(2-ethylhexyl)phthalate in patients undergoing CAPD treatment. - PubMed - NCBI n.d.
- [113] Jacobson MS, Kevy SV, Grand RJ. Effects of a plasticizer leached from polyvinyl chloride on the subhuman primate: a consequence of chronic transfusion therapy. *J Lab Clin Med* 1977;89:1066–79.
- [114] Doull J, Cattley R, Elcombe C, Lake BG, Swenberg J, Wilkinson C, et al. A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999;29:327–57. <https://doi.org/10.1006/rtph.1999.1296>.
- [115] HealthCanada\_2002\_DEHP\_Rpt\_Sum.pdf. 2002.
- [116] Sampson J, de Korte D. DEHP-plasticised PVC: relevance to blood services. *Transfus Med* 2011;21:73–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2010.01056.x>.
- [117] Butch SH, Knafl P, Oberman HA, Bartlett RH. Blood utilization in adult patients undergoing extracorporeal membrane oxygenated therapy. *Transfusion* 1996;36:61–3.
- [118] Koch HM, Angerer J, Drexler H, Eckstein R, Weisbach V. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) exposure of voluntary plasma and platelet donors. *Int J Hyg Environ Health* 2005;208:489–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.07.001>.
- [119] Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Eckstein R, Weisbach V, Angerer J. Intravenous exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): metabolites of DEHP in urine after a voluntary platelet donation. *Arch Toxicol* 2005;79:689–93. <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0004-x>.
- [120] Mazur HI, Stennett DJ, Egging PK. Extraction of diethylhexylphthalate from total nutrient solution-containing polyvinyl chloride bags. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1989;13:59–62. <https://doi.org/10.1177/014860718901300159>.
- [121] Loff S, Kabs F, Witt K, Sartoris J, Mandl B, Niessen KH, et al. Polyvinylchloride infusion lines expose infants to large amounts of toxic plasticizers. *J Pediatr Surg* 2000;35:1775–81. <https://doi.org/10.1053/jpsu.2000.19249>.
- [122] Pearson SD, Trissel LA. Leaching of diethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride containers by selected drugs and formulation components. *Am J Hosp Pharm* 1993;50:1405–9.
- [123] Weuve J, Sánchez BN, Calafat AM, Schettler T, Green RA, Hu H, et al. Exposure to phthalates in neonatal intensive care unit infants: urinary concentrations of monoesters and oxidative metabolites. *Environ Health Perspect* 2006;114:1424–31. <https://doi.org/10.1289/ehp.8926>.
- [124] Koch HM, Bolt HM, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 2004;78:123–30. <https://doi.org/10.1007/s00204-003-0522-3>.
- [125] Lessmann F, Correia-Sá L, Calhau C, Domingues VF, Weiss T, Brüning T, et al. Exposure to the plasticizer di(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHTP) in Portuguese children - Urinary metabolite levels and estimated daily intakes. *Environ Int* 2017;104:25–32. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.03.028>.

- [126] Schütze A, Otter R, Modick H, Langsch A, Brüning T, Koch HM. Additional oxidized and alkyl chain breakdown metabolites of the plasticizer DINCH in urine after oral dosage to human volunteers. *Arch Toxicol* 2017;91:179–88. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1688-9>.
- [127] Encyclopédie de sécurité et de santé au travail 2015. [https://www.ilo.org/global/topics/safety-and-health-at-work/resources-library/publications/WCMS\\_344668/lang--fr/index.htm](https://www.ilo.org/global/topics/safety-and-health-at-work/resources-library/publications/WCMS_344668/lang--fr/index.htm) (accessed July 22, 2019).
- [128] Toxicity Review of DEHA.pdf n.d.
- [129] Toxicity Review of TOTM.pdf n.d.
- [130] Toxicity Review of DINX.pdf n.d.
- [131] Barreteau H. Atlas de poche de pharmacologie H. Lüllmann, K. Mohr, L. Hein . Médecine Sciences Publications, 4e édition. Lavoisier, Paris (2010). 394 pp., 48 €, ISBN : 978-2-257-00069-9. /data/revues/22111042/v46i2/S2211104211000580/ 2011.
- [132] Kurata Y, Makinodan F, Shimamura N, Katoh M. Metabolism of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): comparative study in juvenile and fetal marmosets and rats. *J Toxicol Sci* 2012;37:33–49.
- [133] Dostal LA, Weaver RP, Schwetz BA. Transfer of di(2-ethylhexyl) phthalate through rat milk and effects on milk composition and the mammary gland. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;91:315–25.
- [134] Calafat AM, Needham LL, Silva MJ, Lambert G. Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics* 2004;113:e429-434.
- [135] Srivastava S, Awasthi VK, Srivastava SP, Seth PK. Biochemical alterations in rat fetal liver following in utero exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Indian J Exp Biol* 1989;27:885–8.
- [136] Calafat AM, Brock JW, Silva MJ, Gray LE, Reidy JA, Barr DB, et al. Urinary and amniotic fluid levels of phthalate monoesters in rats after the oral administration of di(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-butyl phthalate. *Toxicology* 2006;217:22–30. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.08.013>.
- [137] Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Malek NA, Hodge CC, Caudill SP, et al. Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environ Health Perspect* 2004;112:331–8. <https://doi.org/10.1289/ehp.6723>.
- [138] FMPMC-PS - Pharmacologie - Niveau DCEM1 n.d. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/POLY.Chp.4.4.html> (accessed July 22, 2019).
- [139] SCD\_T\_2000\_0327\_TERRIER.pdf n.d.
- [140] Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 2005;79:367–76. <https://doi.org/10.1007/s00204-004-0642-4>.
- [141] Comprendre REACH - ECHA n.d. <https://echa.europa.eu/fr/regulations/reach/understanding-reach> (accessed July 7, 2019).
- [142] REACH 2018 | REACH INFO n.d. [https://reach-info.ineris.fr/REACH\\_2018](https://reach-info.ineris.fr/REACH_2018) (accessed July 7, 2019).

- [143] Good Laboratory Practice (GLP) - OECD n.d. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/good-laboratory-practiceglp.htm> (accessed July 7, 2019).
- [144] La toxicologie. Antidote Europe n.d. <http://antidote-europe.org/methodes-alternatives-recherche-animale/toxicologie/> (accessed July 7, 2019).
- [145] Notions - Qu'est-ce qu'un effet toxique ? - CNESST n.d. <https://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/toxicologie/notions-toxicologie/Pages/05-effet-toxique.aspx> (accessed October 3, 2019).
- [146] Ruaux N. Les perturbateurs endocriniens n.d.:55.
- [147] Des perturbateurs endocriniens dérèglent la thyroïde chez les fillettes - Sciences et Avenir n.d. [https://www.sciencesetavenir.fr/sante/des-perturbateurs-endocriniens-dereglent-la-thyroide-chez-les-fillettes\\_113645](https://www.sciencesetavenir.fr/sante/des-perturbateurs-endocriniens-dereglent-la-thyroide-chez-les-fillettes_113645) (accessed October 3, 2019).
- [148] Morgenstern R, Whyatt RM, Insel BJ, Calafat AM, Liu X, Rauh VA, et al. Phthalates and thyroid function in preschool age children: Sex specific associations. *Environment International* 2017;106:11–8. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.05.007>.
- [149] Clewell RA, Thomas A, Willson G, Creasy DM, Andersen ME. A dose response study to assess effects after dietary administration of diisononyl phthalate (DINP) in gestation and lactation on male rat sexual development. *Reproductive Toxicology* 2013;35:70–80. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.07.008>.
- [150] Waterman SJ, Ambroso JL, Keller LH, Trimmer GW, Nikiforov AI, Harris SB. Developmental toxicity of diisodecyl and diisononyl phthalates in rats. *Reproductive Toxicology* 1999;13:131–6. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(99\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(99)00002-7).
- [151] Hannas BR, Lambright CS, Furr J, Howdeshell KL, Wilson VS, Gray LE. Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisoheptyl phthalate, and diisononyl phthalate. *Toxicol Sci* 2011;123:206–16. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr146>.
- [152] Patyna PJ, Brown RP, Davi RA, Letinski DJ, Thomas PE, Cooper KR, et al. Hazard evaluation of diisononyl phthalate and diisodecyl phthalate in a Japanese medaka multigenerational assay. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006;65:36–47. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.05.023>.
- [153] Santangeli S, Maradonna F, Zanardini M, Notarstefano V, Gioacchini G, Forner-Piquer I, et al. Effects of diisononyl phthalate on *Danio rerio* reproduction. *Environ Pollut* 2017;231:1051–62. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.060>.
- [154] David RM, White RD, Larson MJ, Herman JK, Otter R. Toxicity of Hexamoll® DINCH® following intravenous administration. *Toxicology Letters* 2015;238:100–9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.07.013>.
- [155] Campioli E, Lee S, Lau M, Marques L, Papadopoulos V. Effect of prenatal DINCH plasticizer exposure on rat offspring testicular function and metabolism. *Sci Rep* 2017;7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11325-7>.
- [156] Campioli E, Duong TB, Deschamps F, Papadopoulos V. Cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid diisononyl ester and metabolite effects on rat epididymal stromal vascular fraction differentiation of adipose tissue. *Environ Res* 2015;140:145–56. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.03.036>.

- [157] Barber ED, Topping DC. Subchronic 90-day oral toxicology of Di(2-ethylhexyl) terephthalate in the rat. *Food and Chemical Toxicology* 1995;33:971–8. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00060-F](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00060-F).
- [158] Wirnitzer U, Rickenbacher U, Katerkamp A, Schachtrupp A. Systemic toxicity of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHT) in rodents following four weeks of intravenous exposure. *Toxicology Letters* 2011;205:8–14. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.04.020>.
- [159] Deyo JA. Carcinogenicity and chronic toxicity of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHT) following a 2-year dietary exposure in Fischer 344 rats. *Food and Chemical Toxicology* 2008;46:990–1005. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.037>.
- [160] L. Earl Gray Jr, Joseph Ostby, Johnathatn Furr, Matthew Price, D. N Rao Veeramachanneni, Luisse Parks. Perinatal Exposure to the Phthalates DEHP, BBP, and DINP, but Not DEP, DMP, or DOTP, Alters Sexual Differentiation of the Male Rat. *Toxicological Sciences* 2000:350–65.
- [161] OECD SIDS BIS(2-ETHYLHEXYL)ADIPATE. 2000 n.d.
- [162] Boran H, Terzi S. Stress-Induced Transcriptional Changes and DNA Damage Associated with Bis(2-ethylhexyl) Adipate Exposure in Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. *Bull Environ Contam Toxicol* 2017;99:308–14. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2116-4>.
- [163] Dalgaard M, Hass U, Vinggaard AM, Jarfelt K, Lam HR, Sørensen IK, et al. Di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) induced developmental toxicity but not antiandrogenic effects in pre- and postnatally exposed Wistar rats. *Reproductive Toxicology* 2003;17:163–70. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00149-1).
- [164] Miyata K, Shiraishi K, Houshuyama S, Imatanaka N, Umano T, Minobe Y, et al. Subacute oral toxicity study of di(2-ethylhexyl)adipate based on the draft protocol for the “Enhanced OECD Test Guideline no. 407.” *Arch Toxicol* 2006;80:181–6. <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0030-8>.
- [165] Kang JS, Morimura K, Toda C, Wanibuchi H, Wei M, Kojima N, et al. Testicular toxicity of DEHP, but not DEHA, is elevated under conditions of thioacetamide-induced liver damage. *Reprod Toxicol* 2006;21:253–9. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.09.013>.
- [166] OECD SIDS TRIS(2-ETHYLHEXYL)BENZENE-1,2,4-TRICARBOXYLATE 2002 n.d.
- [167] Chen X-H, Ma L, Hu Y-X, Wang D-X, Fang L, Li X-L, et al. Transcriptome profiling and pathway analysis of hepatotoxicity induced by tris (2-ethylhexyl) trimellitate (TOTM) in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2016;41:62–71. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.11.007>.
- [168] Michael A. Babich, U.S. Consumer Product Safety Commission. Review of Exposure and Toxicity Data for Phthalate Substitutes -2010. n.d.
- [169] ter Veld MGR, Schouten B, Luisse J, van Es DS, van der Saag PT, Rietjens IMCM, et al. Estrogenic potency of food-packaging-associated plasticizers and antioxidants as detected in ERalpha and ERbeta reporter gene cell lines. *J Agric Food Chem* 2006;54:4407–16. <https://doi.org/10.1021/jf052864f>.
- [170] Michael Babich. 2010. Toxicity Review for Diisononyl Phthalate (DINP) - toxicityDINP.pdf n.d.

- [171] European Council for Plasticisers and Intermediates. Review of Recent Scientific Data on Di-isononyl Phthalate (DINP) and Risk Characterisation for its use in Toys and Childcare articles. ecpi; 2009.
- [172] European Chemicals Bureau, EUROPEAN COMMISSION, JOINT RESEARCH CENTRE. European Union Risk Assessment Report. 1,2-benzenedicarboxylic acid, di-C8-10-branched alkyl esters, C9-rich and di-“isononyl” phthalate (DINP). n.d.
- [173] Brodell RT, Torrence BP. Sqwish Ball dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1992;26:641–2.
- [174] Babich MA, Chen S-B, Greene MA, Kiss CT, Porter WK, Smith TP, et al. Risk assessment of oral exposure to diisononyl phthalate from children’s products. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004;40:151–67. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2004.06.005>.
- [175] EVIDENCE ON THE CARCINOGENICITY OF Diisononyl Phthalate (DINP) October 2013. OEHA. n.d.
- [176] Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P, et al. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-isononyl phthalate. *Reproductive Toxicology* 2002;16:679–708. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00034-5).
- [177] ARTHUR W. LINGTON,2 MICHAEL G. BIRD, ROBERT T. PLUTNICK, WILLIAM A. STUBBLEFIELD,3 AND ROBERT A. SCALA4. ARTHUR W. LINGTON, et al. Chronic Toxicity and Carcinogenic Evaluation of Diisononyl Phthalate in Rats. 1997;7 9-8 9.
- [178] Borch J, Ladefoged O, Hass U, Vinggaard AM. Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. *Reprod Toxicol* 2004;18:53–61. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2003.10.011>.
- [179] BASF - Product Information BASF Chemicals NAFTA - HEXAMOLL® DINCH® n.d. [https://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA~en\\_US/Catalog/ChemicalsNAFTA/info/BASF/PRD/30085336](https://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA~en_US/Catalog/ChemicalsNAFTA/info/BASF/PRD/30085336) (accessed September 21, 2017).
- [180] Maag J, Lassen C, Brandt UK, Kjølholt J, Molander L, Mikkelsen SH. Identification and assessment of alternatives to selected phthalates. COWI: Environmental Project No. 1341 2010 Miljøprojekt. Copenhagen: Danish EPA n.d.
- [181] David RM, Lockhart LK, Ruble KM. Lack of sensitization for trimellitate, phthalate, terephthalate and isobutyrate plasticizers in a human repeated insult patch test. *Food Chem Toxicol* 2003;41:589–93.
- [182] Faber WD, Deyo JA, Stump DG, Ruble K. Two-generation reproduction study of di-2-ethylhexyl terephthalate in Crl:CD rats. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 2007;80:69–81. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20108>.
- [183] Smyth HF, Carpenter CP, Weil CS. Range-finding toxicity data: List IV. *AMA Arch Ind Hyg Occup Med* 1951;4:119–22.
- [184] Reisenbichler H, Eckl PM. Genotoxic effects of selected peroxisome proliferators. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1993;286:135–44. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90177-H](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90177-H).
- [185] NTP National Toxicology Program. Carcinogenesis bioassay of di(2-ethylhexyl) adipate (CAS no. 103-23-1) in F344 rats and B6C3F1 mice. NTP-80-29 NIH Publ. 1982; 81:1768 n.d.

- [186] Wato E, Asahiyama M, Suzuki A, Funyu S, Amano Y. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 9) Effects of 2- or 4-week repeated dose studies and fertility study of di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) in female rats. *J Toxicol Sci* 2009;34 Suppl 1:SP101-109.
- [187] Stahlhut RW, van Wijngaarden E, Dye TD, Cook S, Swan SH. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect* 2007;115:876–82. <https://doi.org/10.1289/ehp.9882>.
- [188] Meeker JD, Ferguson KK. Relationship between urinary phthalate and bisphenol A concentrations and serum thyroid measures in U.S. adults and adolescents from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2008. *Environ Health Perspect* 2011;119:1396–402. <https://doi.org/10.1289/ehp.1103582>.
- [189] Bis(2-ethylhexyl) terephthalate - Registration Dossier - ECHA n.d. <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15238/7/5/2> (accessed October 13, 2019).
- [190] THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. REGULATION (EU) 2017/ 745 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL - of 5 April 2017 - on medical devices, amending Directive 2001/ 83/ EC, Regulation (EC) No 178/ 2002 and Regulation (EC) No 1223/ 2009 and repealing Council Directives 90/ 385/ EEC and 93/ 42/ EEC. n.d.
- [191] Kambia NK, Séverin I, Farce A, Moreau E, Dahbi L, Duval C, et al. In vitro and in silico hormonal activity studies of di-(2-ethylhexyl)terephthalate, a di-(2-ethylhexyl)phthalate substitute used in medical devices, and its metabolites. *J Appl Toxicol* 2019;39:1043–56. <https://doi.org/10.1002/jat.3792>.
- [192] Correia-Sá L, Schütze A, Norberto S, Calhau C, Domingues VF, Koch HM. Exposure of Portuguese children to the novel non-phthalate plasticizer di-(iso-nonyl)-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH). *Environment International* 2017;102:79–86. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.02.001>.
- [193] Zeman FA, Boudet C, Tack K, Floch Barneaud A, Brochot C, Péry ARR, et al. Exposure assessment of phthalates in French pregnant women: results of the ELFE pilot study. *Int J Hyg Environ Health* 2013;216:271–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.12.005>.
- [194] Department of Health. National Industrial Chemical. Notification and Assessment Scheme. Australian Gouvernement L 7. NICNAS. New chemical assessments n.d. <https://www.nicnas.gov.au/chemical-information/new-chemical-assessments> (accessed September 24, 2018).
- [195] Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances* 2017;3:e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
- [196] Anderson WAC, Castle L, Hird S, Jeffery J, Scotter MJ. A twenty-volunteer study using deuterium labelling to determine the kinetics and fractional excretion of primary and secondary urinary metabolites of di-2-ethylhexylphthalate and di-iso-nonylphthalate. *Food and Chemical Toxicology* 2011;49:2022–9. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.05.013>.
- [197] Nuti F, Hildenbrand S, Chelli M, Wodarz R, Papini AM. Synthesis of DEHP metabolites as biomarkers for GC–MS evaluation of phthalates as endocrine disrupters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005;13:3461–5. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.03.005>.

[198] Takahashi Y, Shibata T, Sasaki Y, Fujii H, Bito Y, Suehiro S. Di(2-ethylhexyl) phthalate exposure during cardiopulmonary bypass. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2008;16:4–6. <https://doi.org/10.1177/021849230801600102>.

## ANNEXES

### ANNEXE 1

#### Supporting information

##### *In vitro* cytotoxic effect of dehp alternatives plasticizers and their corresponding primaries metabolites on I929 cell line

Teuta Eljezi,<sup>a, b, 1</sup> Pierre Pinta,<sup>c, 1</sup> Damien Richard,<sup>d</sup> Jérémy Pinguet,<sup>d</sup> Jean-Michel Chezal,<sup>a</sup> Marie-Christine Chagnon,<sup>e</sup> Valérie Sautou,<sup>b, f</sup> Gaël Grimandi,<sup>c</sup> Emmanuel Moreau,<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Clermont Université, Université d'Auvergne, Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée, BP 184, F-63005 Clermont-Ferrand, France. Inserm, U 990, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Centre Jean Perrin, F-63011 Clermont-Ferrand, France.

<sup>b</sup> CHU Clermont-Ferrand, Pôle Pharmacie, Rue Montalembert, 63003 Clermont-Ferrand, France

<sup>c</sup> INSERM, U791, LIOAD, Nantes, F-44042, France Université de Nantes

<sup>d</sup> Service de Pharmacologie, Hôpital Gabriel-Montpied, CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

<sup>e</sup>Nutrition Physiology and Toxicology Team (NUTox), UMR U866 INSERM, Université de Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

<sup>f</sup> Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 4676C-BIOSENS, 63000 Clermont-Ferrand, France.

\* corresponding author: [emmanuel.moreau@udamail.fr](mailto:emmanuel.moreau@udamail.fr)

<sup>1</sup> both authors contributed equally

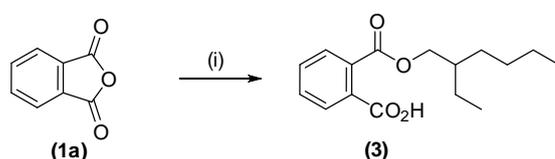
<b>Materials for chemical syntheses</b>	<b>S2</b>
<b>Access to MEHP (scheme 1S)</b>	<b>S3</b>
<b>Access to MOTM (Scheme 2S)</b>	<b>S3</b>
<b>Access to MEHA (Scheme 3S)</b>	<b>S3</b>
<b>Access to MEHT (Scheme 4S)</b>	<b>S4</b>
<b>Access to MINCH and MINP (Scheme 5S)</b>	<b>S6</b>
<b>Access to MMeOCH and MMeOP (Scheme 6S)</b>	<b>S8</b>
<b>Table S1</b>	<b>S13</b>
<b>Materials for Chemical Syntheses</b>	

Unless otherwise mentioned, all manipulations were performed under argon; all reagents were purchased from the following commercial suppliers: Sigma-Aldrich, Acros Organics, Carlo Erba, TCI Europa, Alpha Aesar. Anhydrous DMF, anhydrous triethylamine were purchased from Acros Organics. THF was distilled over benzophenone and sodium. Dichloromethane was distilled over hydride calcium. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were acquired on Bruker AC-200 operating at 200 and 50 MHz for  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR, respectively. All  $^1\text{H}$  NMR spectra are reported in  $\delta$  units, parts per million (ppm) and the coupling constants are indicated in hertz (Hz). The following abbreviations are used for spin multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, and br = broad. The chromatographic system consisted of an HTC PAL autosampler, a Transcend TLX-1 HTLC System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, United States), The HRMS analysis was performed using a Thermo Exactive benchtop Orbitrap<sup>®</sup> instrument. TLC was performed on glass backed silica gel sheets (60F254 plates) and visualized under UV light (254 nm). Column chromatography was performed using silica gel normal phase (35-70  $\mu\text{m}$ ). Uncorrected melting points (Mp) were recorded on a Wagner & Munz Heizbank-Koffler apparatus. Infrared spectra (IR) were recorded on a Bruker FT Vector 22. The purity of all our synthesized metabolites and their corresponding intermediates were superior to 95%.

### Access to MEHP

MEHP was synthesized according to the procedure described by F. Nüti et al.<sup>1</sup>

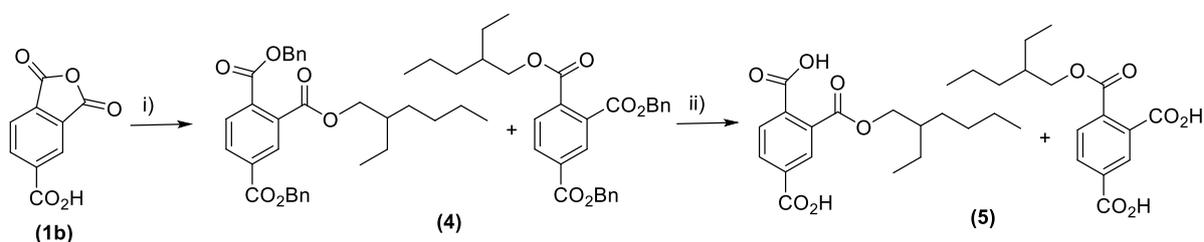
Scheme 1S<sup>a</sup>: Synthesis of MEHP



<sup>a</sup>Conditions and Reactants: 2-ethylhexanol (2), pyridine dry, 135°C

### Access to MOTM

Scheme 2S<sup>a</sup>: Synthesis of MOTM



<sup>a</sup>Conditions and Reactants: i) a) 2-ethylhexanol (2), pyridine dry, 135°C; b) BnBr, DCM dry,  $\text{NEt}_3$ ,  $\Delta$ ; ii)  $\text{H}_2$ , Ethanol dry, rt.

**1,4-dibenzyl-2-(2-ethylhexyl)benzene-1,2,4-tricarboxylate and**

**2,4-dibenzyl-1-(2-ethylpentyl)benzene-1,2,4-tricarboxylate (4)**

To a solution of 1,2,4-Benzenetricarbonyl anhydride (**1b**) (1.46 g, 7.59 mmol, 1eq.) dissolved in dry pyridine (0.72 mL), 2-ethylhexanol (**2**) (1.11 mL, 7.59 mmol, 1eq.) was added. The resulting mixture was heated at 125 °C (external temperature) for 5h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched with water (50 mL) and then extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a solution of hydrochloric acid (10%) (100 mL) to remove pyridine. Finally, the organic phase was extracted with a solution of potassium carbonate (0.4 M) (100mL). The aqueous basic layer was acidified to pH 1 with a solution of hydrochloric acid (1M) and then extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 100mL). The combined organic layer were washed with brine (200mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under reduce pressure. To the crude product ((0.75 g, 2.32 mmol, 1eq.) dissolved in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) was added Et<sub>3</sub>N (0.38 mL, 2.57 mmol, 1.2 eq), benzyl bromide (0.55 mL, 4.59 mmol, 2 eq.). The resulting mixture was stirred at reflux for 12 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was poured into water (180 mL) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 100 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified by column chromatography (dichloromethane/ethanol 98/2, v/v) to afford (**4**) (50%). IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1110, 1228, 1455, 1721, 2859, 2928, 2957; <sup>1</sup>H NMR  $\delta$  CDCl<sub>3</sub>  $\delta$  1.01-1.09 (m, 12H), 1.44-1.58 (m, 16H), 1.82-1.83 (m, 3H), 4.24-4.45 (m, 4H), 5.51 (s, 8H), 7.42-7.58 (m, 15H), 7.89 (m, 2H), 8.36 (m, 2H), 8.57 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR  $\delta$  CDCl<sub>3</sub>  $\delta$  10.8, 13.9, 22.8, 23.5, 28.7, 30.1, 38.4, 67.2, 67.6, 67.8, 68.3, 127.6-130.2 (m), 131.6, 132.0, 132.2, 135.0, 135.3, 135.9, 136.5, 164.6, 166.2, 166.4, 166.7, 167.0;

SM HRMS (ESI) calculated for C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub> m/z [M-H<sup>+</sup>]<sup>+</sup> calc 516.6232; found: 516.6386

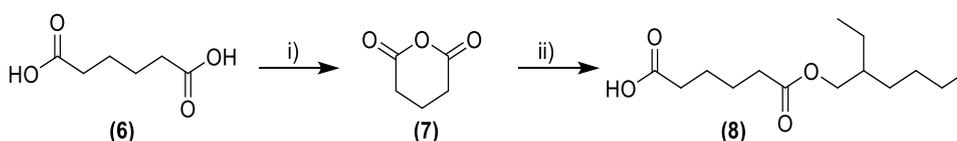
## 2-(((2-Ethylhexyl)oxy)carbonyl)terephthalic acid and

## 4-(((2-ethylpentyl)oxy)carbonyl)isophthalic acid (**5**)

To a solution of (**4**) (0.120g, 0.28 mmol) dissolved in anhydrous EtOH (30 mL), 10% Pd/C was added (0.012 g), and the resulting mixture was degazed, then stirred vigorously under hydrogen atmosphere (1 atm) for 8 h. The solution was filtered through a Celite<sup>®</sup> 521 pad. The filtrate was concentrated under reduce pressure and the crude product was purified on silica gel eluted with (dichloromethane/ethanol 9/1, v/v) to afford (**5**) (0.60g, 67%). IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1245, 1283, 1417, 1694, 1732, 2539, 2858, 2929, 2956; <sup>1</sup>H NMR (acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$  1.19 (m, 6H), 1.13-2.07 (m, 14H), 2.11 (m, 2H), 3.67 (m, 2H), 4.28 (m, 2H), 7.83 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8 Hz, 1H), 8.28-8.32 (m, 2H), 8.36 (m, 1H), 8.52 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$  10.2, 13.3, 22.5, 23.4, 27.6, 28.0, 28.4, 28.6, 28.8, 29.2, 30.1, 38.5, 67.5, 128.5, 129.1, 129.5, 130.2, 131.5, 131.8, 132.3, 132.7, 136.2, 137.5, 165.1, 166.3, 166.4, 167.0, 167.1; HRMS for C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> m/z [M-H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>calc: 321.1343; found: 321.1344.

## Access to MEHA

Scheme 3S<sup>a</sup>: Synthesis of MEHA



<sup>a</sup>Conditions and Reactants: i) anhydride acetique, 138°C; ii) 2-ethylhexanol (**2**), pyridine, 125°C.

### Dihydro-2H-pyran-2,6(3H)-dione (**7**)<sup>2</sup>

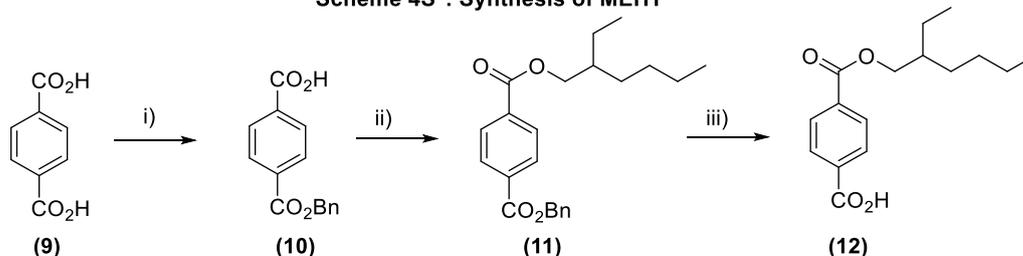
Compound (**7**) was synthesized from adipic acid (**6**) according to procedure described by J. A. Cisneros and *al.*<sup>2</sup>

### 6-((2-Ethylhexyl)oxy)-6-oxohexanoic acid (**8**)

To a solution of dihydro-2H-pyran-2,6(3H)-dione (**7**)<sup>2</sup> (1.14 g, 7.7 mmol, 1 eq.) dissolved in dry pyridine (1 mL), 2-ethyl hexanol (**2**) was added (1.15 g, 8.7 mmol, 1 eq.). The resulting mixture was stirred for 12h at 125 °C (external temperature). The mixture was quenched with cold water (100 mL) and extracted with Et<sub>2</sub>O (4 x 100 mL). The combined organic layers were washed with a solution of hydrochloric acid 10% (100mL), and then washed with 0.4 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 mL). The aqueous basic layer was acidified to pH 1 with a solution of hydrochloric aide (1M) and then extracted with Et<sub>2</sub>O (4 x 150mL). The combined organic layer were washed with brine (200 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel eluted with (ethyl acetate/cyclohexane; 5/5; v/v) to afford (**6**) (99 %). IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1175, 1460, 1733, 2873, 2929, 2958 ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.88-0.95 (m, 6H), 1.38-1.47 (m, 8H), 1.57-1.59 (m, 5H), 2.37-2.41 (m, 4H), 4.15 (d, J = 7.0 Hz, 2H) ; <sup>13</sup>C NMR (50MHz)  $\delta$  10.8, 13.8, 22.74, 23.6, 23.9, 24.1, 28.7, 30.2, 33.5, 33.8, 38.5, 66.7, 173.4, 179.2 ; HRMS for C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub> m/z [M+H]<sup>+</sup> calc: 259.1903; found: 259.1909.

## Access to MEHT

Scheme 4S<sup>a</sup>: Synthesis of MEHT



<sup>a</sup>Conditions and Reactants: i) BnBr, Et<sub>3</sub>N, DMF dry, rt; ii) a) oxalyl chloride, DMF, DCM dry, rt; b) 2-ethylhexanol (**2**), Et<sub>3</sub>N, DCM dry, rt; iii) H<sub>2</sub>, Pd/C, ethanol.

#### 4-((Benzyloxy)carbonyl)benzoic acid (**10**)<sup>3</sup>

To a solution of terephthalic acid (**9**) (0.5 g, 3.0 mmol, 1eq) dissolved in anhydrous DMF (30 mL) was added Et<sub>3</sub>N (0.5 mL, 3.0 mmol, 1 eq.) and stirred for 5 minutes at room temperature. Benzyl bromide (0.42 mL, 4.0 mmol, 1.3 eq.) was added dropwise and the resulting suspension was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was poured into water (180 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with water (5 x 100 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified by column chromatography (ethyl acetate/cyclohexane, 3/7, v/v). A first elution afforded dibenzyl terephthalate (34 %).<sup>4</sup> A second elution afforded white crystals of 4-((benzyloxy)carbonyl)benzoic acid (**9**) (58 %). Mp: 178°C ± 1°C; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1256, 1278, 1278, 1442, 1454, 1682, 1705, 2816; <sup>1</sup>H NMR (DMSO)  $\delta$  5.41 (s, 2H), 7.55-7.42 (m, 5H), 8.16-8.07 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO)  $\delta$  66.8, 128.4, 128.5, 128.8, 129.4, 129.7, 129.9, 131.1, 133.4, 135.2, 136.1, 149.1, 165.2, 166.8; HRMS for C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> calc: 256.0735 [M-H]<sup>-</sup>; found: 255.0661

#### Benzyl (2-ethylhexyl)terephthalate (**11**)

To a solution of (**10**) (1.79 g, 7.0 mmol, 1eq.) dissolved in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL), oxalyl chloride (1.52g, 10 mmol, 1.4 eq.) and anhydrous DMF (three drops) were successively added. After stirring at room temperature for 12 h, the reaction solvent was evaporated under reduce pressure to afford benzyl 4-(chlorocarbonyl)benzoate which was used without purification for the followed step (2.19 g, 7.0 mmol). To a solution of the crude product (2.19 g, 7.0 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2-ethylhexanol (**2**) (1.79 g, 10 mmol, 1.4 eq), Et<sub>3</sub>N (1.9 mL) were added. After stirring at room temperature for 12h, the reaction mixture was extracted with ethyl acetate (4 x 100 mL). The combined organic layers were washed with water (100 mL), brine (200 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel eluted with (ethyl acetate/cyclohexane; 1/9; v/v) to afford (**11**) (86%) as a clear liquid. IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1246, 1263, 1717, 2859, 2958; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.99 (m, 6H), 1.43-1.57 (m, 10H), 1.72-1.81 (m, 1H), 4.29 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 5.43 (s, 2H), 7.39-7.49 (m, 5H), 8.11-8.22 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  11.1, 14.1, 23.0, 24.0, 29.0, 30.6, 38.9, 67.1, 67.8, 128.3, 128.4, 128.7, 129.5, 129.7, 133.8, 134.5, 135.7, 165.7, 165.9. HRMS for C<sub>28</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>calc: 368.1987; found: 368.3069

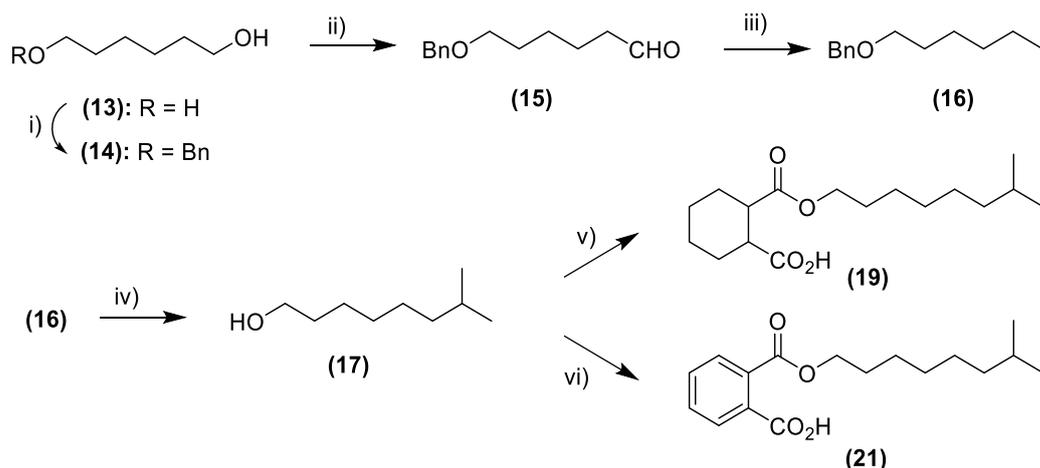
#### 4-(((2-Ethylhexyl)oxy)carbonyl)benzoic acid (**12**)

To a solution of (**11**) (1.27 g, 3.4 mmol) dissolved in anhydrous EtOH (140 mL), 10% Pd/C was added (0.13 g), and the resulting mixture was degazed twice, then stirred vigorously under hydrogen atmosphere (1 atm) for 5 h. The solution was filtered through a Celite® 521 pad. The filtrate was concentrated under reduce pressure and the crude product was purified on silica gel eluted with (ethyl acetate/cyclohexane; 1/9; v/v) to afford (**12**) (99 %). Mp: 102.4 °C ± 1°C; IR  $\nu$ (cm<sup>-1</sup>) 1260, 1313, 1678, 1707, 2856, 2928, 2957; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ 1.01 (m, 3H), 1.34-1.52

(m, &2H), 1.76-1.82(m, 1H), 4.34 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 8.20-8.26 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.1, 14.1, 23.2, 24.0, 29.0, 30.1, 38.9, 67.9, 129.6, 130.1, 133.0, 135.1, 165.9, 171.4; HRMS for  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  calc: 278.74; found: 277.1447.

### Access to MINCH and MINP

Scheme 5S<sup>a</sup>: Synthesis of MINCH (19) and MINP (21)



#### 5-(Benzyloxy)pentan-1-ol (14)<sup>5</sup>

Compound **(14)** was synthesized from hexanoic diacid **(13)** according to procedure described by R. S. Narayan.<sup>5</sup>

#### 6-(Benzyloxy)hexanal (15)<sup>5</sup>

Compound **(15)** was synthesized from 6-(benzyloxy)hexan-1-ol **(14)** according to procedure described by R. S. Narayan.<sup>5</sup>

#### (((7-Methyloct-6-en-1-yl)oxy)methyl)benzene (16)

To a stirred suspension of isopropyltriphenylphosphonium iodide (10.89 g, 25.1 mmol, 12.6 eq.) in dry THF freshly distilled (100 mL) cooled at  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , *n*-BuLi (4.7 mL, 2.5 M in hexane) was added dropwise. After stirring for 10 min at room temperature, the reaction was cooled to  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  and **(15)**<sup>4</sup> (0.5 g, 2.4 mmol) dissolved in dry THF (5 mL) was added dropwise. After stirring for 3 h at room temperature, the reaction mixture was poured into water (150 mL) and extracted with ethyl acetate (4 x 150 mL). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel eluted with (dichloromethane/cyclohexane; 3/7; v/v) to afford **(16)** (68 %). IR  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 1453, 2855, 2929;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.52-1.56 (m, 6H), 1.78 (m, 6H), 2.15 (m, 2H), 3.65 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 4.69 (s, 2H), 5.31 (m, 1H), 7.45-7.54 (m, 5H);  $^{13}\text{C}$  NMR (50MHz)

$\delta$  17.8, 25.9, 26.0, 28.1, 29.6, 29.9, 70.6, 73.0, 124.9, 127.6, 127.7, 128.5, 131.4, 138.9; HRMS for  $C_{16}H_{24}O$   $[M+H]^+$ : calc: 232.1827; found: 233.1901

### **7-methyloctan-1-ol (17)**

To a solution of **(16)** (0.31 g, 2.1 mmol) dissolved in anhydrous EtOH (100 mL), 10% Pd/C (31 mg) was added. The resulting mixture was degazed twice, the stirred vigorously under hydrogen atmosphere (6 bars) overnight. The resulting mixture was filtered through a Celite® 545 pad. The crude product was purified on silica gel eluted with (dichloromethane/cyclohexane; 6/4; v/v) to afford **(17)** (63%). IR  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) 1466, 1724, 2854, 2925, 2952, 3324;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  1.00 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.32-1.34 (m, 2H), 1.41-1.52 (m, 6H), 1.64-1.67(m, 4H), 3.87(t, 1H, J = 8.0 Hz);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  22.6, 26.1, 27.4, 28.0, 29.7, 32.7, 39.0, 65.2; HRMS or GC/MS of this compound was not recorded because it is volatile too much.

### **2-(((7-Methyloctyl)oxy)carbonyl)cyclohexanecarboxylic acid (19)**

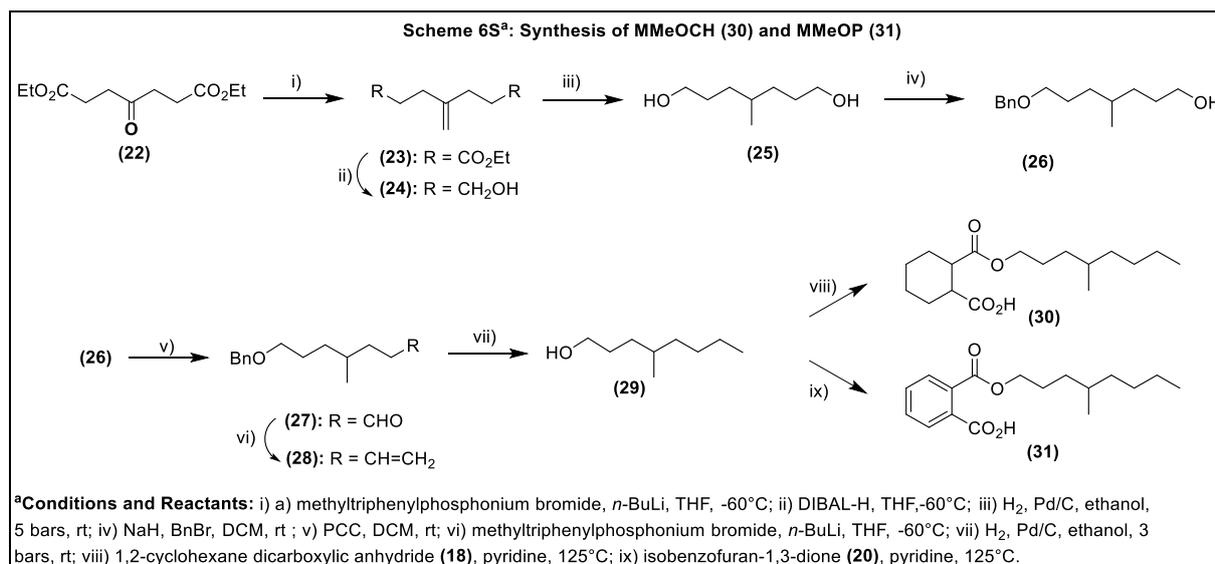
To a solution of hexahydroisobenzofuran-1,3-dione **(18)** (0.162 g, 1.0 mmol, 1.5 eq.) dissolved in dry pyridine (0.1 mL), **(17)** (0.11 g, 0.76 mmol, 1eq.) was added. The resulting mixture was stirred for 3h at 115 °C (external temperature). The mixture was quenched with cold water (50 mL) and extracted with diethyl ether (4 x 80 mL). The combined organic layers were washed with a solution of hydrochloric 10% (100 mL). Finally, the mixture was extracted with 0.4M  $K_2CO_3$  (100 mL). The aqueous basic layer was acidified to pH 1 with a solution of hydrochloric acid (1M) and then extracted with diethyl ether (4 x 100mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over  $MgSO_4$  and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel eluted with (dichloromethane/methanol; 9/1; v/v) to afford **(19)** (67%). IR  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) 1452, 1702, 1731, 2856, 2926;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  0.97 (d, J = 6.5 Hz, 6H), 1.00 (s, 3H), 1.31-2.19 (m, 19H), 2.89 (m, 2H) 4.23 (m,2H), 9.61 (brs, 1H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  22.6, 23.6, 23.9, 25.9, 26.39, 26.9, 27.9, 28.5, 29.4, 38.9, 42.4, 42.6, 64.6, 173.6, 175.9. HRMS for  $C_{17}H_{30}O_4$   $[M+H]^+$ : calc: 299.2216; found: 299.2222.

### **2-(((7-Methyloctyl)oxy)carbonyl)benzoic acid (21)**

To a solution of isobenzofuran-1,3-dione **(20)** (0.088 g, 0.5 mmol) dissolved in dry pyridine (0.1 mL), **(17)** (0.092 g, 0.6 mmol) was added. The resulting mixture was stirred for 3h at 125 °C (external temperature). The mixture was quenched with cold water (50 mL) and extracted with diethyl ether (8 x 40 mL). The combined organic layers were washed with a solution of hydrochloric 10% (100 mL). Finally, the mixture was extracted with 0.4 M  $K_2CO_3$  (100 mL). The aqueous basic layer was acidified to pH 1 with a solution of hydrochloric acid (1M) and then extracted with diethyl ether (4 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over  $MgSO_4$  and evaporated under reduce pressure. The crude product

was purified on silica gel eluted with (dichloromethane/methanol; 9/1; v/v) to afford **(21)** (52%). IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$  1284, 1698, 1726, 2855, 2925;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.96 (d,  $J = 6.5$  Hz, 6H), 1.28-1.45 (m, 9H), 1.85 (m, 2H), 4.47 (t, 2H,  $J = 6.7$  Hz), 7.78 (m, 2H), 7.81 (m, 1H), 8.04 (m, 1H) 9.71 (brs, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22.7, 26.0, 27.3, 27.6, 28.4, 29.5, 29.7, 38.9, 66.2, 128.8, 129.8, 130.6, 132.1, 133.6, 168.0, 172.5; HRMS for  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : calc: 293.1747; found: 293.1748.

### Access to MMeOCH and MMeOP



### Diethyl 4-methyleneheptanoic diacid (**23**)

To a stirred solution of triphenylmethylphosphonium bromide (4.65 g, 60 mmol, 1.5 eq.) in dry THF freshly distilled (200 mL), cooled at -15°C, was added dropwise *n*-BuLi (2.5 M in hexane) (18.75 mL, 1.5 eq.) under argon atmosphere. After stirring for 20 min at -15°C, diethyl 4-oxopimelate (**22**) (5.0 g, 21.71 mmol, 1 eq.) was added and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was quenched with acetone (50 mL). The reaction mixture was filtered, concentrated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel eluted with EtOAc/Cyclohexane, 3/7, v/v). Yield : 80%; IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$  ; 1733, 2009, 2026, 2036.  $^1\text{H NMR}$   $\delta$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 1.19 (t, 6H,  $^3J = 7.1$  Hz), 2.31-2.27 (m, 4H), 2.42-2.48 (m, 4H) 4.09-4.04 (q, 4H,  $^3J = 7.1$  Hz), 4.71 (s, 2H) ;  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.2, 31.0, 32.7, 60.3, 109.7, 146.3, 173.0. HRMS or GC/MS of this compound was not recorded because it is volatile too much.

### 4-Methyleneheptane-1,7-diol (**24**)

To a solution of dry THF freshly distilled (200 mL) cooled at -78 °C, diisobutylaluminium hydride (1M in heptane) (80 mL, 79 mmol, 4 eq.) was added, followed by a solution of (**23**) (4.59 g, 20 mmol, 1 eq.) dissolved in dry THF (10 mL). Then the resulting mixture was stirred for 24h at

room temperature. The reaction mixture was quenched with a solution of 1N HCl (200 mL) and extracted with EtOAc (4 x 300 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 x 500 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel eluted with (EtOAc / cyclohexane; 9/1; v/v). Yield : 97%; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) ; 1055, 1441, 1644, 2938, 3313; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.65-1.57 (m, 4H), 2.01 (t, 4H, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz), 3.51 (t, 4H, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz), 3.76 (s, 2H), 4.67 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  30.6, 32.2, 62.1, 109.3, 148.8; HRMS for C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: calc: 145.1223; found: 145.1224.

#### 4-Methylheptane-1,7-diol (25)

To a solution of **(24)** (4.24 g, 29 mmol) dissolved in EtOH (100 mL), 10% Pd/C (0.42 g) was added. The resulting mixture was degazed twice, then stirred under hydrogen atmosphere (3 bars) overnight. The reaction mixture was filtered through a Celite<sup>®</sup> 545 pad. The crude product was purified on silica gel eluted with (ethyl acetate /cyclohexane; 9/1; v/v). Yield : 75%; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1377, 1456, 2867, 2931, 3317 ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.88 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz), 1.19-1.22 (m, 2H), 1.35-1.38 (m, 3H), 1.53-1.59 (m, 4H), 1.60-1.49 (m, 4H), 2.26 (brs, 2H), 3.59 (t, 4H, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz) ; <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  19.6, 30.2, 32.4, 32.8, 63.2 ; HRMS for C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: calc: 147.1379; found: 147.1379.

#### 7-(Benzyloxy)-4-methylheptan-1-ol (26)<sup>6</sup>

To a suspension of sodium hydride (60% dispersion in oil, 1.16 g, 48 mmol, 1eq.) in dry DMF (30 mL), cooled at 0°C, a solution of **(25)** (4.34 g, 29 mmol, 1.2 eq.) dissolved in dry DMF (10mL) was added dropwise. After stirring for 10 min, benzyl bromide (3.31 mL, 25 mmol, 1 eq.) was added cautiously. The resulting mixture was stirred for 18h at room temperature. The reaction mixture was then quenched by water (300 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 400 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 x 100 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel eluted with (EtOAc /cyclohexane; 4/6; v/v). Yield : 37 %; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1054, 1377, 1454, 2867, 29,31, 3318; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.91 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz), 1.21-1.28 (m, 2H), 1.38-1.41 (m, 3H), 1.55-1.66 (m, 4H), 1.95 (brs, 1H), 3.46 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz), 3.61 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz), 4.52 (s, 1H), 7.27-7.30 (m, 1H) 7.35-7.39 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  19.6, 27.2, 30.2, 32.5, 32.8, 33.3, 63.3, 70.8, 72.9, 127.6, 127.7, 128.4, 138.7; HRMS for C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: calc: 237.1849; found: 237.1850.

#### 7-(Benzyloxy)-4-methylheptanal (27)<sup>5</sup>

To a solution of **(26)**<sup>6</sup> (0.92 g, 4 mmol, 1 eq.) dissolved in dry dichloromethane, PCC was added (1.59 g, 7 mmol, 3eq.). The reaction mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature for 5 h. Anhydrous diethyl ether (150 mL) was added and the reaction mixture was filtered through a Celite<sup>®</sup> 545 pad. The filtrate was concentrated under reduce pressure and the crude product was purified on silica gel eluted with (EtOAc /cyclohexane; 5/5; v/v).

Yield : 97 %; IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$  1273, 1703, 2928;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.92 (d,  $^3J = 6.3$  Hz, 3H), 1.24-1.29 (m, 2H), 1.38-1.49 (m, 3H), 1.59-1.71, (m, 3H), 2.40-2.43 (m, 2H), 3.47 (t, 2H,  $^3J = 6.6$  Hz), 4.52 (s, 2H), 7.29-7.36 (m, 5H), 9.77 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  19.3, 21.0, 27.2, 28.8, 32.3, 33.0, 41.6, 70.6, 72.9, 127.5, 127.6, 128.4, 138.7, 203.0; HRMS for  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : calc: 235.1692; found: 235.1687.

### **(((4-mMethyloct-7-en-1-yl)oxy)methyl)benzene (28)**

To a suspension of isopropyl triphenylphosphonium iodide (4.5g, 13mmol, 12.6 eq.) dissolved in dry THF (100 mL), cooled at  $-78$  °C, *n*-BuLi (2.4 mL, 2.5 M in hexane) was added dropwise. After stirring for 10 min at room temperature, the reaction mixture was cooled to  $-78$  °C and a solution of aldehyde **(27)**<sup>5</sup>. (0.3 g, 1 mmol, 1 eq.) dissolved in dry THF (5 mL) was added dropwise. After stirring for 3 h at room temperature, the reaction mixture was poured into water (200 mL) and extracted with EtOAc (3 x 350 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 x 300 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel eluted with (EtOAc/cyclohexane; 1/9; v/v). Yield : 98 %; IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$  1097, 1273, 1453, 1720, 2851, 2924;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.89 (d, 3H,  $^3J = 6.4$  Hz), 1.18-1.24 (m, 3H), 1.36-1.46 (m, 3H), 1.59-1.68 (m, 2H), 2.03-2.09 (m, 2H), 3.47 (t, 2H,  $^3J = 6.7$  Hz), 4.47 (s, 2H), 4.98-5.03 (dq,  $^3J = 17.1\text{Hz}$ ,  $J=5\text{Hz}$ , 2H vinyl), 4.95-4.92 (m, 1H), 5.85-5.78 (m, 1H), 7.35 (d,  $^3J = 4.4$  Hz, 4H aromatic), 7.30-7.26 (m, 1H aromatic).

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  19.4, 27.3, 31.3, 32.2, 33.2, 36.1, 70.8, 72.9, 114.1, 127.4, 127.6, 128.4, 138.7, 139.3; HRMS or GC/MS of this compound was not recorded because it is volatile too much.

### **4-Methyloctan-1-ol (29)**

To a solution of **(28)** (0.2 g, 0.8 mmol) dissolved in EtOH (40 mL), 10% Pd/C (0.02 g) was added. The resulting mixture was degassed twice, then stirred at room temperature under hydrogen atmosphere (3 bars) overnight. The reaction mixture was filtered through a Celite<sup>®</sup> 545 pad. The crude product was purified on silica gel eluted with (EtOAc /cyclohexane; 1/9; v/v). Yield : 67%; IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$  1066, 1732, 2186, 2923, 2965;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.86 (d,  $^3J = 3.2$  Hz, 3H), 0.87 (d,  $^3J = 3.4$  Hz, 3H), 1.18-1.11 (m, 2H), 1.36-1.22 (m, 7H), 1.62-1.52 (m, 2H), 3.64-3.61 (t,  $^3J = 6.6$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.1, 19.6, 23.0, 29.3, 30.4, 32.9, 33.1, 36.7, 63.5; HRMS or GC/MS of this compound was not recorded because it is volatile too much.

### **2-(((4-Methyloctyl)oxy)carbonyl)cyclohexane-1-carboxylic acid (30)**

To a solution of **(29)** (0.04 g, 0.27 mmol, 1 eq.) dissolved in dry pyridine (1 mL), hexahydroisobenzofuran-1,3-dione **(18)** (0.030 g, 0.19 mmol, 1.2 eq.) was added. The resulting mixture was heated at  $125$  °C for 12 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched with cold water (50 mL) and extracted with dichloromethane (4 x 50 mL). The

combined organic layers were washed with a solution of 10% HCl (100 mL) to remove pyridine. Finally, the organic layer was extracted with a solution of 0.4M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 mL). The aqueous basic layer was acidified to pH 1 with a solution of 1M HCl and then extracted with dichloromethane (4 x 100mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and then evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel eluted with (dichloromethane/ethanol; 9/1; v/v). Yield : 96%; IR  $\nu$ (cm<sup>-1</sup>) 1178, 1220, 1703, 1731, 2855, 2924; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.89-0.84 (m, 6H), 1.08-1.15 (m, 2H), 1.20-1.23 (m, 5H), 1.29-1.31 (m, 3H), 1.35-1.46 (m, 3H), 1.54-1.61 (m, 2H), 1.75-1.78 (m, 2H), 1.99-2.04 (m, 2H), 2.80-2.86 (m, 2H), 4.02-4.07 (m, 2H) ; HRMS for C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: calc: 299.2216; found: 299.2221.

### **2-(((4-Methyloctyl)oxy)carbonyl)benzoic acid (31)**

To a solution of (**29**) (0.04 g, 0.27 mmol, 1 eq.) dissolved in dry pyridine (1 mL), isobenzofuran-1,3-dione (**20**) (0.035 g, 0.23 mmol, 1.2 eq.) was added. The resulting mixture was heated at 125°C for 12 h. The reaction mixture was quenched with cold water (50 mL) and extracted with dichloromethane (4 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a solution of 10% HCl (100 mL) to remove pyridine. Finally, the organic layer was extracted with a solution of 0.4M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 mL). The aqueous layer was acidified to pH 1 with a solution of 1M HCl and then extracted with dichloromethane (4 x 100mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel eluted with (dichloromethane/ethanol; 9/1; v/v).Yield : 91 %; IR  $\nu$ (cm<sup>-1</sup>) 1121, 1259, 1716, 2848, 2916; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.88-0.84 (m, 6H), 1.13-1.19 (m, 3H), 1.28-1.30 (m, 2H), 1.39-1.41 (m, 3H), 1.73-1.76 (m, 3H), 4.31 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H), 7.56-7.60 (m, 2H), 7.71 (m, 1H), 7.91 (m, 1H); HRMS for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: calc: 293.1747; found: 293.1751.

Table S1

Samples	Average target concentration (mg/mL)	Average measured concentration (mg/mL)	Standard deviation	CV <sup>a</sup> (%)
DINP	10	9.97	1.16	1.16
DEHP	10	11.32	0.21	1.86
TOTM	10	10.53	0.42	4.03
DEHT	10	9.07	0.29	3.20
DEHA	10	10.17	0.18	1.76
DINCH	10	8.54	0.14	1.64

Control of plasticizers stocks concentration solutions assayed by GC-MS (triplicate).  
<sup>a</sup>coefficient of variation.

## REFERENCES

1. F. Nüti; S. Hildenbrand; M. Chelli; R. Wodarz; A. M. Papini. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 10, 3461-3465.
  2. J. A. Cisneros; E. Björklund; I. González-Gil; Y. Hu; A. Canales; F. J. Medrano; A. Romero; S. Ortega-Gutiérrez; C. J. Fowler; M. L. López-Rodríguez. *J. Med.Chem.* **2012**, 55, 824-836.
  3. O. Kadkin; K. Osajda; P. Kaszynski; T. A. Barber. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2003**, 41, 1114–1123.
  4. J. Craig; J. A. E. Donahue, C. Warner. *J. Chem. Educ.*, **2003**, 80, 1, 79.
  5. R. S. Narayan; B. Borhan. *J.Org. Chem.* **2006**, 71, 1416-1429.
- . K. J. Frankowski; J. E. Golden; Y. Zeng; Y. Lei; J. Aubé. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6018–6024.

## ANNEXE 2

### Supporting information

#### ***In vitro* cytotoxic effects of secondary metabolites of DEHP and its alternative plasticizers DINCH and DINP on a L929 cell line**

**Teuta Eljezi,<sup>a,b,1</sup> Pierre Pinta,<sup>c,1</sup> Fabien Nativel<sup>c</sup> Damien Richard,<sup>d</sup> Jérémy Pinguet,<sup>d</sup> Olivier Roy,<sup>e</sup> Valérie Sautou,<sup>b</sup> Gaël Grimandi,<sup>c</sup> Emmanuel Moreau,<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> Clermont Université, Université d'Auvergne, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, BP 184, F-63005 Clermont-Ferrand, France. Inserm, U 1240, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Centre Jean Perrin, F-63011 Clermont-Ferrand, France.

<sup>b</sup> Université Clermont Auvergne, CHU Clermont Ferrand, CNRS, SIGMA Clermont, ICCF, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

<sup>c</sup> Inserm, UMR 1229, Regenerative Medicine and Skeleton (RMes), Université de Nantes, ONIRIS, 44042 Nantes, France.

<sup>d</sup> Service de Pharmacologie, CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France.

<sup>e</sup> Université Clermont Auvergne , CNRS, SIGMA Clermont, ICCF, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

\* corresponding author: emmanuel.moreau@uca.fr

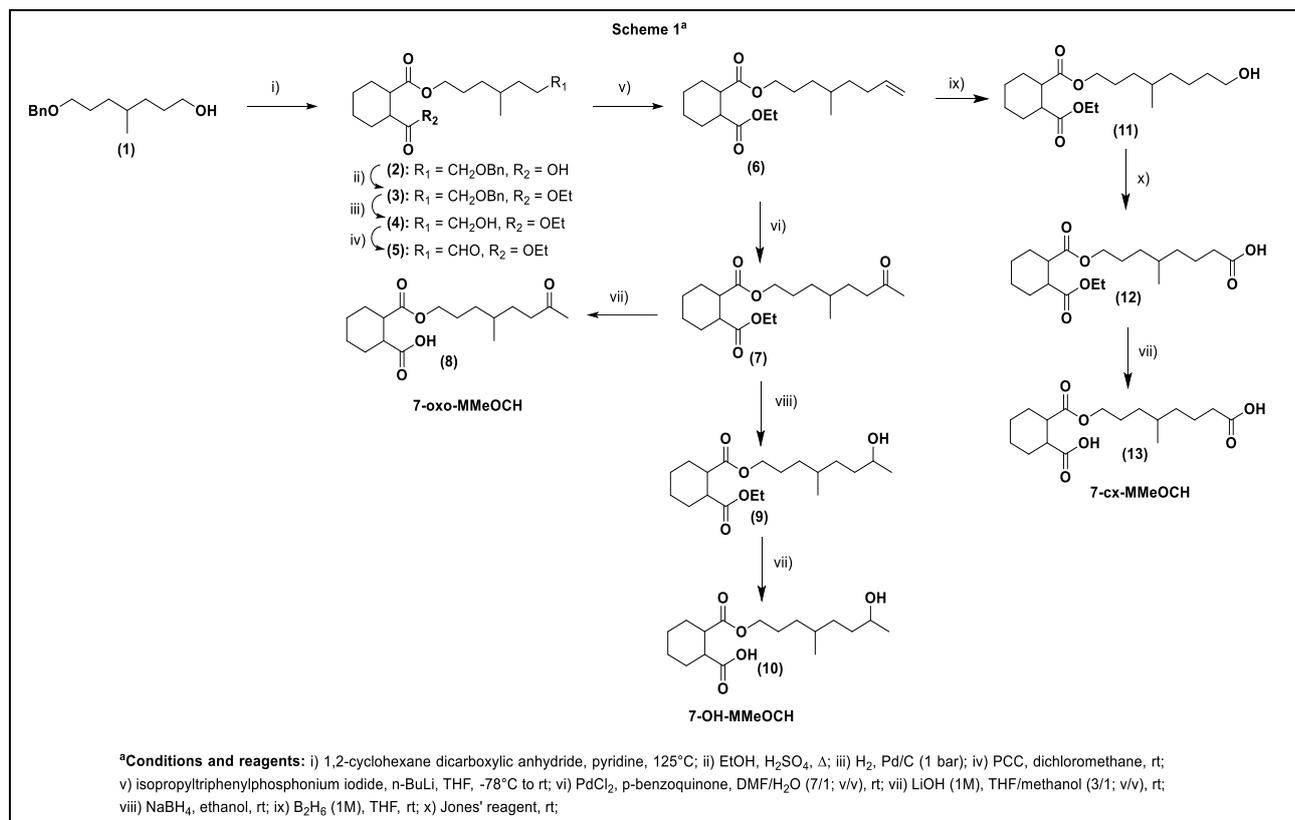
<sup>1</sup> both authors contributed equally

<b>Materials for Chemical Syntheses</b>	<b>S2</b>
<b>Access to 7-oxo-MMeOCH, 7-OH-MMeOCH and 7-cx-MMeOCH</b>	<b>S2-S7</b>
Access to 7-oxo-MMeOP, 7-OH-MMeOP and 7-cx-MMeOP	S8-S13

## Materials for Chemical Syntheses

Unless otherwise mentioned, all manipulations were performed under argon; all reagents were purchased from the following commercial suppliers: Sigma-Aldrich, Acros Organics, Carlo Erba, TCI Europa, Alpha Aesar. Anhydrous DMF, anhydrous trimethylamine, anhydrous pyridine were purchased from Acros Organics. THF was distilled over benzophenone and sodium. Dichloromethane was distilled over hydride calcium. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were acquired on Bruker AC-200 or 400 operating at 200 or 400 for  $^1\text{H}$  NMR and 50 or 100 MHz for  $^{13}\text{C}$  NMR, respectively. All  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra are reported in  $\delta$  units, parts per million (ppm). Coupling constants were indicated in Hertz (Hz). The following abbreviations are used for spin multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, and brs = broad singlet. The chromatographic system consisted of an HTC PAL autosampler, a Transcend TLX-1 HTLC System (ThermoFisher Scientific, San Jose, United States), The HRMS analysis was performed using a Thermo Exactive benchtop Orbitrap<sup>®</sup> instrument. TLC were performed on glass backed silica gel sheets (60F254 plates) and visualized under UV light (254 nm). Revelators used were  $\text{KMnO}_4$  (1.5 g  $\text{KMnO}_4$ , 10 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , and 1.25 mL 10%  $\text{NaOH}$  in 200 mL water) and ninhydrin (1.5 g ninhydrin in 100 mL of n-butanol with 3 mL  $\text{AcOH}$  add). Column chromatography were performed using silica gel normal phase (35-70  $\mu\text{m}$ ). Infrared spectra (IR) were recorded on a Bruker FT Vector 22. A HPLC Prominence-*i* LC-2030 CSCHIMADZU with Kinetex 5 $\mu\text{m}$  EVO C18 (Phenomenex) column, pore diameter (A) 82-102, particle size ( $\mu\text{m}$ ) 4.5-4.8, column dimensions: 50 x 4.6 mm was used to purify secondary metabolites. Uncorrected melting points (Mp) were recorded on an Electrothermal IA9300 apparatus. Compounds 5-oxo-MEHP, 5-OH-MEHP and 5-cx-MEHP were synthesized from the procedure described by Nüti et al. (Nüti et al, 2005). Dimethylsulfoxide DMSO (ref: D8418 CAS: 67-68-5), Mouse fibroblasts L929 (ref: 85011425 lot: 10L019), MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, ref: M2128) were also purchased from Sigma Aldrich. Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (fetal calf serum (SVF), phosphate saline buffer (PBS), penicillin (P), streptomycin (S), and actinomycin D) were purchased from Life technologies SAS, France.

## Scheme 1: Access to 7-oxo-MMeOCH, 7-OH-MMeOCH and 7-cx-MMeOCH



### 1-(7-(Benzyloxy)-4-methylheptyl) 2-ethylcyclohexane-1,2-dicarboxylate (3)

To a solution of 7-(benzyloxy)-4-methylheptan-1-ol (**1**) (Eljezi et al. 2017) (0.43 g, 1.81 mmol, 1 eq.) dissolved in dry pyridine (1 mL), 1,2-cyclohexane dicarboxylic anhydride (0.030 g, 4.65 mmol, 2.5 eq.) was added. The resulting mixture was heated at 125°C for 12 h. After cooling to room temperature, cold water (50 mL) was added and the resulting mixture was extracted with dichloromethane (4 x 50 mL). The combined organic layers were washed with 10% HCl (100 mL) to remove pyridine. Finally, the mixture was extracted with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.4M, 100 mL). The aqueous layer was acidified to pH 1 with 1M HCl and then extracted with dichloromethane (4 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel (dichloromethane/ethanol, 9/1, v/v) to afford compound (**2**). <sup>1</sup>H NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.81 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 3H), 1.05-1.11 (m, 2H), 1.18 (m, 1H), 1.25-1.35 (m, 6H), 1.47-1.55 (m, 5H), 1.67-1.72 (m, 2H), 1.95-1.91 (m, 2H), 2.74, (m, 2H), 3.37 (t, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 2H), 3.97 (t, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 2H), 4.42 (s, 2H), 7.18 - 7.24 (m, , 5H); HRMS for C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> m/z [M+H]<sup>+</sup> calc.: 391.2479; found: 391.2469. To a solution of compound (**2**) (0.22 g, 0.56 mmol) dissolved in absolute ethanol (10 mL), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 mL) was added. The resulting mixture was heated at reflux for 12 h. After cooling to room temperature, dichloromethane (100 mL) was added and washed with

a saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (100 mL), followed by washing with brine (100 mL). Organic layer was then dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane, 5/5, v/v). Yield : 93%; IR  $\nu$ (cm<sup>-1</sup>) 1127, 1173, 1301, 1367, 1452, 1726, 2855, 2933; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.81 (d, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 3H), 1.11-1.77 (m, 4H), 1.22-1.34 (m, 4H), 1.39-1.61 (m, 4H), 1.63-1.71 (m, 3H), 1.88-1.93 (m, 2H), 2.72-2.74 (m, 2H), 3.37 (t, <sup>3</sup>J = 6,7 Hz, 2H), 3.97 (m, 2H), 4.05 (qd, J = 7.1, 3.6, 2H), 4.43 (s, 2H), 7.23-7.28 (m, 5H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.2, 19.5, 23.8, 23.8, 26.2, 26.3, 27.3, 32.4, 33.1, 33.2, 42.6, 60.3, 64.8, 70.8, 72.9, 127.5, 127.6, 128.4, 138.6, 173.3, 173.8; HRMS for C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub> m/z [M+H]<sup>+</sup> calc.: 419.2792; found: 419.2796.

#### **1-Ethyl 2-(6-hydroxy-4-methylhexyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (4)**

To a solution of **(3)** (0.14 g, 0.35 mmol) dissolved in absolute ethanol (35 mL), 10% Pd/C (0.01 g) was added. The resulting mixture was degased twice and stirred at room temperature under hydrogen atmosphere (1 bar) overnight. The crude product was then filtered through a Celite® 545 pad. The filtrate was evaporated under reduce pressure and was then purified on silica gel (ethyl acetate /cyclohexane, 5/5, v/v). Yield : 67%; IR  $\nu$ (cm<sup>-1</sup>) 1128, 1175, 1302, 1338, 1372, 1450, 1727, 2857, 2933, 3439; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.81 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 3H), 1.13-1.07 (m, 2H), 1.13-1.20 (m, 4H), 1.28-1.36 (m, 5H), 1.41-1.53 (m, 6H), 1.72-1.67 (m, 2H), 1.99-1.91(m, 2H), 2.74 (m, 2H), 3.54 (t, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 2H), 3.98 ( t, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 2H), 4.04 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  19.6, 23.8, 23.9, 26.2, 26.4, 27.0, 30.2, 32.3, 32.8, 33.0, 42.7, 42.7, 60.4, 60.5, 63.2, 64.8, 173.8, 173.9; HRMS for C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub> m/z [M+H]<sup>+</sup> calc.: 329.2322; found: 329.2327.

#### **1-Ethyl 2-(4-methyl-7-oxoheptyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (5)**

To a solution of **(4)** (0.2 g, 0.6 mmol, 1 eq.) dissolved in dry dichloromethane was added PCC (0.4 g, 1.85 mmol, 3 eq.). The reaction mixture was vigorously stirred under argon atmosphere at room temperature for 5 h. Anhydrous diethyl ether (150 mL) was added and the reaction mixture was then filtered through a Celite® 545 pad. The filtrate was concentrated under reduce pressure, and the crude product was purified on silica gel (ethyl acetate /cyclohexane, 5/5, v/v). Yield : 97%; IR  $\nu$ (cm<sup>-1</sup>) 1128, 1302, 1373, 1450, 1725, 2858, 2933; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.86 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H), 1.22 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 3H), 1.35-1.56 (m, 7H), 1.58-1.67 (m, 4H), 1.76-1.78 (m, 2H), 1.97-2.03 (m, 2H), 2.38-2.44 (m, 2H), 2.80 (m, 2H), 4.05 (t, <sup>3</sup>J = 3.1 Hz, 2H), 4.12 (q, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H), 9.77 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.2, 19.1, 23.8, 23.8, 26.2, 26.2, 26.4, 28.9, 32.2, 33.0, 41.8, 42.7, 42.8, 60.4, 64.7, 173.8, 173.9, 202.8; HRMS for C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub> m/z [M+H]<sup>+</sup> calc.: 327.2166; found: 327.2155.

#### **1-Ethyl 2-(4-methyloct-7-en-1-yl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (6)**

To a stirred suspension of triphenylmethylphosphonium bromide (2.59 g, 7.2 mmol, 12.6 eq) dissolved in dry THF (80 mL), cooled at -78 °C under argon atmosphere, *n*-BuLi (1.8 mL, 1.6 M

in hexane) was added dropwise. After stirring for 10 min at room temperature, the reaction was cooled to -78 °C and a solution of **(5)** (0.18 g, 0.5 mmol, 1 eq.) dissolved in dry THF (5 mL) was added dropwise. After stirring for 3 h at room temperature, the reaction mixture was poured into water (200 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 x 100 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane, 5/5, v/v). Yield : 80%; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1173, 1302, 1376, 1450, 1727, 2857, 2931; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.87 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 3H), 1.14-1.22 (m, 5H), 1.31-1.41 (m, 6H), 1.46-1.57 (m, 3H), 1.68-1.76 (m, 2H), 1.97-2.06 (m, 4H), 2.79 (m, 2H), 4.01-4.06 (m, 2H), 4.12 (m, 2H), 4.93-4.95 (m, 1H), 4.91 (m, 1H), 4.97 (m, 1H), 5.79 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.3, 19.5, 23.9, 23.9, 26.2, 26.4, 31.4, 32.1, 33.1, 36.2, 42.7, 42.8, 60.4, 60.5, 64.9, 114.3, 139.3, 173.8, 173.9; HRMS for C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub> m/z [M+H]<sup>+</sup> calc.: 325.2373 ; found: 325.2365.

### **1-Ethyl 2-(4-methyl-7-oxooctyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (7)**

To a solution of PdCl<sub>2</sub> (10mg, 0.056 mmol, 0.01eq.) and *p*-benzoquinone (0.12 g, 1.1 mmol, 2.9 eq.) dissolved in DMF/H<sub>2</sub>O (2.5 mL; 7/1; v/v), a solution of compound **(6)** (0.12 g, 0.37 mmol, 1 eq.) dissolved in DMF/H<sub>2</sub>O (2.5 mL; 7/1; v/v) was added dropwise. After stirring overnight at room temperature, the reaction mixture was quenched with 3M HCl (25 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 15 mL). The combined organic layers were washed with 10% NaOH (20 mL) and brine (20 mL). The aqueous layer was acidified to pH 1 with 3M HCl and then extracted with diethyl ether (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane, 5/5, v/v). Yield : 20%; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1171, 1302, 1367, 1450, 1720, 2858, 2932; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.88 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 3H), 1.09-1.22 (m, 4H), 1.24-1.37 (m, 5H), 1.47-1.62 (m, 5H), 1.74-1.78 (m, 2H), 1.96-2.04 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.36-2.47 (m, 2H), 2.79 (m, 2H), 4.02-4.06 (m, 2H), 4.09-4.14 (qd, <sup>3</sup>J = 7.1, 2.7 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.2, 19.2, 21.0, 23.8, 23.9, 26.2, 26.4, 30.0, 30.6, 32.2, 32.9, 41.4, 42.7, 42.8, 60.4, 64.7, 173.7, 173.9, 209.3; HRMS for C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub> m/z [M+H]<sup>+</sup> calc.: 341.22322; found: 341.2310.

### **2-(((4-Methyl-7-oxooctyl)oxy)carbonyl)cyclohexane-1-carboxylic acid (8) (7-oxo-MMeOCH)**

To a solution of **(7)** (0.08 g, 0.2 mmol, 1 eq.) dissolved in THF/methanol (2.8 mL; 3/1; v/v), was added a solution of LiOH (1M in water) (0.9 mL, 0.92 mmol, 4 eq.). After stirring 24 h at room temperature, the reaction solvent was evaporated under reduced pressure. Water (25 mL) was added to the residue, the resulting mixture was then acidified with 1M HCl to pH 1 and extracted with ethyl acetate (3 x 80 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL) and brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane, 5/5, v/v). Yield : 45%; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1465, 1700, 2870, 2928; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$  0.88 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H), 1.02-1.07 (m, 2H), 1.19-1.48 (m, 9H), 1.62-1.68 (m, 2H), 1.91-1.93 (m, 2H), 1.95 (s, 3H), 2.29-

2.35 (m, 2H), 2.67-2.70 (m, 2H), 3.38 (t,  $^3J = 6.5$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  19.8, 24.5, 26.0, 27.0, 31.2, 31.4, 33.0, 33.7, 41.5, 42.8, 45.2, 55.0, 62.7, 175.1, 176.4, 208.5; HRMS for  $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc. : 313.2009; found : 313.2014.

### **1-Ethyl 2-(7-hydroxy-4-methyloctyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (9)**

To a suspension of  $\text{NaBH}_4$  (0.13 g, 3.4 mmol, 4 eq.) in absolute ethanol (2.58 mL), compound **(7)** (0.23 g, 0.6 mmol, 1eq.) was slowly added. After stirring 2 h at room temperature, the reaction mixture was quenched with  $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL), then extracted with ethyl acetate (3 x 30 mL), washed with brine (50 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane, 5/5, v/v). Yield : 98 %; IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$  1174, 1246, 1302, 1372, 1450, 1727, 2857, 2930, 3446;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.84-0.86 (m, 3H), 1.17 (d,  $^3J = 6.2$  Hz, 3H), 1.32 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H), 1.24-1.69 (m, 12H), 1.70-1.86 (m, 3H), 1.94-2.01 (m, 3H), 2.79 (m, 2H), 3.75 (m, 1H) 4.01-4.04 (m, 2H), 4.09-4.13 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.2, 19.7, 23.6, 23.9, 25.9, 26.4, 32.5, 32.7, 32.8, 33.1, 36.85, 42.7, 60.4, 64.8, 68.4, 173.8, 173.9; HRMS for  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc.: 343.2406; found : 343.2392.

### **2-(((7-Hydroxy-4-methyloctyl)oxy)carbonyl)cyclohexane-1-carboxylic acid (10) 7-OH-MMeOCH**

To a solution of **(9)** (0.20 g, 0.59 mmol, 1eq.) dissolved in a mixture of THF/methanol (2.40 mL; 3/1; v/v), was added a solution of  $\text{LiOH}$  (1M in water) (1.11 mL, 1.16 mmol, 2 eq.). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 14 h. The reaction solvent was evaporated under reduced pressure. Water (30 mL) was added to the residue. The resulting mixture was acidified with 1M  $\text{HCl}$  solution to pH 1 and then extracted with ethyl acetate (3 x 40 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL) and brine (50 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/ethanol, 95/5, v/v). Yield : 36 %; IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$  1376, 1452, 1700, 2857, 2928, 3337;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.81-0.87 (m, 3H), 1.02-1.08 (m, 3H), 1.21 (q,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H), 1.32-1.46 (m, 6H), 1.48-1.62 (m, 4H), 1.71-1.82 (m, 2H), 1.94-1.97 (m, 3H), 2.79-2.71 (m, 2H), 3.56 (t,  $^3J = 6.5$  Hz, 2H), 3.70-3.80 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  19.6, 23.3, 23.7, 29.9, 32.4, 32.6, 32.7, 36.3, 36.6, 63.1, 68.3, 68.6, 170.1; HRMS for  $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc.: 315.2166; found: 315.2170.

### **1-Ethyl 2-(8-hydroxy-4-methyloctyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (11)**

To a solution of **(6)** (0.50 g, 1.54 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous THF (20 mL), cooled at  $0^\circ\text{C}$  under argon atmosphere,  $\text{B}_2\text{H}_6$  (1M in THF) (0.04 g, 1.54 mmol, 1 eq.) was added dropwise. After stirring at room temperature for 1 h, excess of hydride was destroyed with  $\text{H}_2\text{O}$  (0.02 mL). After stirring for 5 min, a 3M  $\text{NaOH}$  solution (0.136 mL) and 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.136 mL) were successively added and the resulting mixture was heated at  $50^\circ\text{C}$  for 1 h. After cooling at room

temperature, water (30 mL) was added. The resulting mixture was extracted with diethyl ether (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane, 5/5, v/v). Yield : 60 %; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1174, 1302, 1376, 1450, 1727, 2858, 2930, 3434; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.83 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 3H), 1.14-1.06 (m, 2H), 1.21 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 3H), 1.26-1.37 (m, 6H), 1.46-1.62 (m, 5H), 1.69-1.76 (m, 2H), 1.90-1.97 (m, 4H), 2.28 (m, 1H), 2.76 (m, 2H), 3.58 (m, 2H), 4.00 (t, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 2H), 4.10-4.04 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  13.9, 19.5, 21.1, 23.2, 23.8, 26.2, 26.3, 32.5, 33.1, 33.0, 36.7, 42.6, 42.7, 60.4, 60.5, 62.9, 64.9, 171.3, 173.9; HRMS for C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> calc.: 343.2406; found : 343.2409.

### **8-((2-(Ethoxycarbonyl)cyclohexane-1-carbonyl)oxy)-5-methyloctanoic acid (12)**

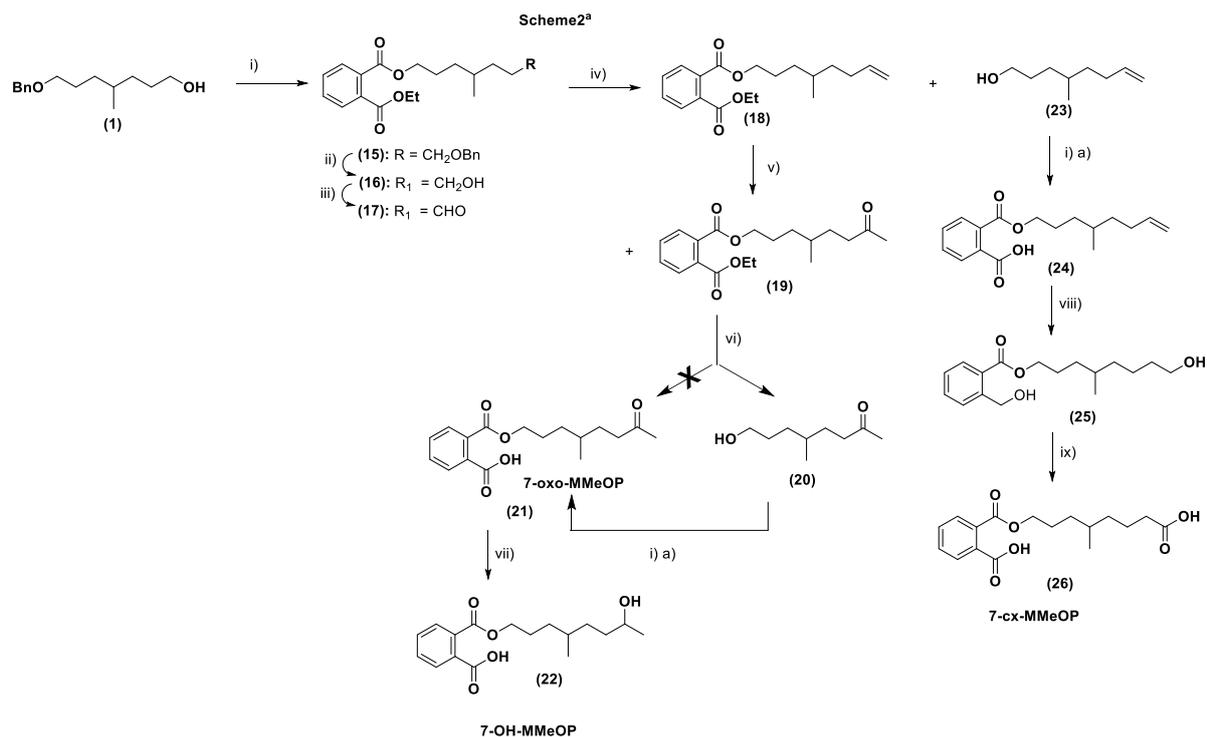
To a solution of **(11)** (0.12 g, 0.39 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous acetone, cooled at -20°C, Jones' reagent (0.38 mL, 1 eq.) (freshly prepared from CrO<sub>3</sub> (6.7 g) dissolved in concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6 mL) and H<sub>2</sub>O (50 mL)) was added dropwise. The resulting mixture was stirred for 1 h. After filtering the precipitated reduced, the filtrate was quenched by water (30 mL) and the resulting mixture was extracted with diethyl ether (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and filtered. Methanol (10 mL) was added to the solution to eliminate chromium salt residue. The organic layer was extracted with a solution of 0.4M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 x 30 mL). The aqueous layers were acidified to pH 1 with a solution of 3M HCl, then extracted with diethyl ether (3 x 100 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane, 5/5, v/v). Yield : 62 %; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1173, 1302, 1376, 1450, 1727, 2857, 2931; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.88 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H), 1.12-1.18 (m, 2H), 1.22 (m, 3H), 1.26-1.44 (m, 6H), 1.45-1.68 (m, 6H), 1.71-1.77 (m, 2H), 1.95-2.01 (m, 2H), 2.28-2.34 (m, 2H), 2.78-2.81 (m, 2H), 4.01-4.05 (m, 2H), 4.08-4.14 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.3, 19.5, 22.3, 23.8, 26.2, 26.2, 26.4, 32.4, 33.0, 34.3, 36.3, 42.7, 42.8, 60.4, 60.5, 64.9, 173.9, 174.0, 179.5; HRMS for C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> calc.: 357.2198; found : 357.2201.

### **2-(((7-Carboxy-4-methylheptyl)oxy)carbonyl)cyclohexane-1-carboxylic acid (13) (7-cx-MMeOCH)**

To a solution of **(12)** (0.11 g, 0.31 mmol, 1 eq.) dissolved in a THF/methanol (2.70 mL, 3/1, v/v), was added a solution of LiOH (1M in water) (1.24 mL, 1.23 mmol, 4 eq.) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 13 h, then heated at 40 °C for 8 h. After cooling to room temperature, the reaction solvent were evaporated under reduced pressure. Water (30 mL) was added to the residue, and the resulting mixture was acidified with a solution of 1M HCl to pH 1 and then extracted with ethyl acetate (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with water (3 x 300 mL), brine (3 x 30 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl

acetate/cyclohexane, 9/1, v/v). Yield : 52 %; IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$  1376, 1452, 1700, 2857, 2928, 3337;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.86-0.90 (d,  $^3J = 6.3$  Hz, 3H), 1.12-1.18 (m, 2H), 1.29-1.35 (m, 2H), 1.41-1.44 (m, 5H), 1.54-1.67 (m, 6H), 1.73-1.79 (m, 2H), 1.98-2.05 (m, 2H), 2.31-2.35 (m, 2H), 2.85 (m, 2H), 4.03-4.11 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  19.2, 22.2, 23.6, 23.8, 25.8, 26.5, 29.8, 32.3, 32.6, 34.3, 35.7, 42.3, 42.6, 64.7, 179.7, 179.8, 180.2; HRMS for  $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc.: 329,1958; found: 329,1964.

## Scheme 2: Access to 7-oxo-MMeOP, 7-OH-MMeOP and 7-cx-MMeOP



<sup>a</sup>Conditions and reagents: i) a) phthalic anhydride, pyridine, 125 °C; b)  $\text{EtOH}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\Delta$ ; ii)  $\text{H}_2$ , Pd/C (1 bar); iii) PCC, dichloromethane, rt; iv) isopropyltriphenylphosphonium iodide, n-BuLi, THF, -78 °C to rt; v)  $\text{PdCl}_2$ , p-benzoquinone, DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (7/1; v/v), rt; vi)  $\text{LiOH}$  (1M), THF/methanol (3/1; v/v), rt; vii)  $\text{NaBH}_4$ , ethanol, rt; viii)  $\text{B}_2\text{H}_6$  (1M), THF, rt; ix) Jones' reagent, rt;

## Ethyl 7-(benzyloxy)-4-methylheptanoate (15)

To a solution of 7-(benzyloxy)-4-methylheptan-1-ol (**1**) (Eljezi et al. 2017) (0.6 g, 2.54 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous pyridine (4.1 mL), phthalic anhydride (0.030 g, 4.65 mmol, 2.5 eq.) was added. The resulting mixture was heated at 125 °C for 18 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched with cold water (30 mL) and then extracted with dichloromethane (4 x 40 mL). The combined organic layers were washed with a solution of 10% HCl (2 x 50 mL) to remove pyridine. Finally, the mixture was extracted with 0.4M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (100 mL). The aqueous layer was acidified to pH 1 with 1M HCl and then extracted with dichloromethane (4 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated under reduce pressure. To a solution of the crude product (5.38 g, 14 mmol) dissolved in absolute ethanol (100 mL), concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 mL) was added and the resulting mixture was heated at 95 °C for 24 h. After cooling to room

temperature, the reaction solvent was evaporated under reduce pressure. The crude product was dissolved with dichloromethane (100 mL) and washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (50 mL). The organic layer was finally washed with brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane, 3/7, v/v). Yield : 46%; IR  $\nu$ (cm<sup>-1</sup>) 1119, 1273, 1366, 1453, 1579, 1601, 1720, 2853, 2936; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.90 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 3H), 1.17-1.27 (m, 2H), 1.33-1.37 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 3H), 1.39-1.45 (m, 2H), 1.63-1.74 (m, 5H), 3.46 (t, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 2H), 4.29 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H), 4.36 (m, 2H), 4.49 (s, 2H), 7.32-7.34 (m, 5H), 7.51-7.54 (m, 2H), 7.69-7.72 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.2, 19.6, 26.2, 27.4, 32.5, 33.1, 33.3, 61.7, 66.2, 70.8, 73.0, 127.6, 127.7, 128.5, 129.0, 131.1, 132.4, 138.7, 167.7, 167.8; HRMS for C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> calc.: 413.2249 ; found : 413.2257.

#### **Ethyl (7-hydroxy-4-methylheptyl)phthalate (16)**

To a solution of **(15)** (2.67 g, 6.47 mmol) dissolved in absolute EtOH (100 mL) 10% Pd/C (0.27 g) was added. The resulting mixture was degassed twice and then stirred under hydrogen atmosphere (1 bar) overnight. The reaction mixture was filtered through a Celite® 545 pad and the filtrate was evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate /cyclohexane, 5/5; v/v). Yield : 99 %; IR  $\nu$ (cm<sup>-1</sup>) 1273, 1367, 1448, 1579, 1594, 1719, 2934, 3423; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.88 (m, 3H), 1.25-1.17 (m, 2H), 1.36-1.56 (m, 8H), 1.70-1.73 (m, 2H), 1.82 (m, 1H), 3.52-3.59 (m, 2H), 4.25-4.28 (m, 2H), 4.34-4.37 (m, 2H), 7.50-7.52 (m, 2H), 7.69-7.71 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.2, 19.6, 26.1, 30.3, 32.4, 32.8, 33.0, 61.8, 63.3, 66.2, 128.9, 131.1, 132.1, 167.8, 167.8; HRMS for C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> calc.: 323.1780; found: 323.1792.

#### **Ethyl (4-methyl-6-formylhexyl)phthalate (17)**

To a solution of **(16)** (0.35 g, 1.1 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous dichloromethane was added PCC (0.71 g, 3.3 mmol, 3 eq.). The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature under argon atmosphere. After stirring for 5 h, anhydrous diethyl ether (50 mL) was added and the reaction mixture was filtered through a Celite® 545 pad. The filtrate was concentrated under reduce pressure, and the crude product was purified on silica gel (ethyl acetate /cyclohexane, 5/5, v/v). Yield : 97 %; IR  $\nu$ (cm<sup>-1</sup>) 1121, 1273, 1366, 1448, 1579, 1599, 1718, 2957; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.90 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H), 1.27 (m, 2H), 1.35 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 3H), 1.36-1.48 (m, 2H), 1.66-1.75 (m, 3H), 2.40-2.46 (m, 2H), 4.27 (t, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 2H), 4.34 (q, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H), 7.51-7.53 (m, 2H), 7.68-7.72 (m, 2H), 9.76 (t, <sup>3</sup>J = 1.7 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.3, 19.4, 26.2, 28.9, 32.3, 33.0, 41.8, 61.8, 66.1, 128.8, 128.9, 131,19, 132.1, 167.8, 167,9, 202.7; HRMS for C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> calc.: 321.1623; found : 321.1611.

#### **Ethyl (4-methyloct-7-en-1-yl)phthalate (18)**

To a stirred suspension of triphenylmethylphosphonium bromide (4.9 g, 13.7 mmol, 12.6 eq.) in anhydrous THF (100 mL), cooled at  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  under argon atmosphere, *n*-BuLi (4.08 mL, 1.6M in hexane) was added dropwise. After stirring for 10 min at room temperature, the reaction was cooled to  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  and a solution of **(17)** (0.34 g, 1.1 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous THF (5 mL) was added dropwise. After stirring for 4 h at room temperature, the reaction mixture was poured into water (200 mL) and then extracted with ethyl acetate (3 x 200 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 x 300 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane, 5/5, v/v). Yield : 67 %; IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$  1121, 1274, 1366, 1448, 1579, 1600, 1640, 1723, 2957;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.92 (d,  $^3J = 6.3$  Hz, 3H), 1.23-1.27 (m, 2H), 1.38 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H), 1.42-1.48 (m, 3H), 1.74-1.77 (m, 2H), 1.96-2.15 (m, 2H), 4.31 (t,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H), 4.38 (q,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H), 4.91-4.93 (m, 1H), 4.99-5.04 (m, 1H), 5.78-5.82 (m, 1H), 7.54-7.56 (m, 2H), 7.72-7.75 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.2, 19.3, 26.1, 31.3, 32.0, 33.0, 36.0, 61.6, 66.1, 114.2, 128.8, 128.9, 131.0, 132.3, 139.1, 167.6, 167.7; HRMS for  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc.: 319.1831; found: 319.1842. A second elution afforded **4-methyloct-7-en-1-ol (23)**. Yield : 11 %; IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$  1174, 1262, 1377, 1463, 1717, 2852, 2922;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.88 (d,  $^3J = 6.5$  Hz, 3H), 1.15-1.24 (m, 3H), 1.43-1.45 (m, 3H), 1.51-1.61 (m, 2H), 2.01-2.11 (m, 2H), 3.62 (t,  $^3J = 6.6$  Hz, 2H), 4.87-4.92 (m, 2H), 5.75-5.83 (m, 1H); HRMS for  $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc.: 143.1357; found : 143.1368.

### **Ethyl (4-methyl-7-oxooctyl)phthalate (19)**

To a solution of **(18)** (0.20 g, 0.62 mmol, 1 eq.) dissolved in DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (2.5 mL, 7/1, v/v),  $\text{PdCl}_2$  (0.01 g, 0.056 mmol, 0.1 eq.) and *p*-benzoquinone (0.2 g, 1.8 mmol, 3 eq.) were added. After stirring at room temperature for 3 h, the reaction mixture was quenched with a solution of 3M HCl (7 mL) and then extracted with diethyl ether (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a solution of 10% NaOH (10 mL). The aqueous layer was acidified to pH 1 with a solution of 3M HCl and extracted with diethyl ether (3 x 100 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane, 5/5, v/v). Yield : 60 %; IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$  1165, 1274, 1366, 1447, 1579, 1599, 1716, 2956;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.89 (d,  $^3J = 6.3$  Hz, 3H), 1.22-1.24 (m, 2H), 1.36 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 3H), 1.35-1.45 (m, 2H), 1.58-1.74 (m, 1H), 1.63-1.74 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 2.39-2.45 (m, 2H), 4.27 (t,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H), 4.35 (q,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H), 7.51-7.55 (m, 2H), 7.69-7.72 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.2, 19.4, 26.1, 30.0, 30.6, 32.2, 33.0, 41.5, 61.8, 66.1, 128.9, 129.0, 131.1, 132.3, 167.7, 167.8, 209.4; HRMS for  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calc.: 335.1780; found : 335.1788.

### **2-(((4-Methyl-7-oxooctyl)oxy)carbonyl)benzoic acid (21) (7-oxo-MMeOP)**

To a solution of **(20)\*** (0.042 g, 0.26 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous pyridine (20 eq.), phthalic anhydride (0.047 g, 0.33 mmol, 1.2 eq.) was added. The resulting mixture was heated

under argon atmosphere at 125 °C for 18 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched with cold water (10 mL) and then extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with a solution of 10% HCl (2 x 10 mL) to remove pyridine. Finally, the mixture was extracted with 0.4M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (30 mL). The aqueous layer was acidified to pH 1 with 1M HCl and then extracted with dichloromethane (4 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (dichloromethane /ethanol, 9/1, v/v). Yield : 98 %; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1357, 1411, 1458, 1709, 2869, 2928, 3401; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.82 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 3H)  $\delta$  1.19 (m, 2H), 1.46 (m, 3H), 1.71 (m, 4H), 2.16 (s, 3H), 4.30 (m, 2H), 7.56 (m, 2H), 7.71 (m, 1H), 7.87 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  19.3, 25.9, 30.0, 30.8, 31.8, 32.7, 41.4, 66.1, 129.1, 129.8, 131.1, 131.9, 133.1, 167.9, 168.5, 209.1; HRMS for C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> calc.: 307,1540; found : 307,1545.

**Note:** compound **(20)\*** was obtained from following protocol: To a solution of **(19)** (0.07 g, 0.02 mmol, 1 eq.) dissolved in THF/methanol (0.7 mL, 3/1, v/v) was added LiOH (1M in water) (0.4 mL, 0.40 mmol, 2 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction solvent was evaporated under reduced pressure. Water (30 mL) was added to the residue, and the resulting mixture was acidified with a solution of 1N HCl to pH 1 and then extracted with ethyl acetate (3 x 100mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL) and brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane, 5/5, v/v) to afford compound **8-hydroxy-5-methyloctan-2-one (20)** and not expected compound **(21)**. Yield: 95%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.82 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.19 (m, 2H), 1.28 (m, 2H), 1.41-1.57 (m, 4H), 1.97 (s, 3H), 2.34-2.41 (m, 2H), 3.56 (t, J = 6.6 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  21.1, 29.9, 30.2, 30.6, 32.2, 32.7, 41.4, 63.1, 209.5.

### **2-(((7-Hydroxy-4-methyloctyl)oxy)carbonyl)benzoic acid (22) (7-OH-MMeOP)**

To a suspension of NaBH<sub>4</sub> (0.02 g, 0.52 mmol, 4 eq.) in absolute ethanol (1.50 mL), **(21)** (0.04 g, 0.13 mmol, 1 eq.) was slowly added compound. After stirring at room temperature for 2 h, the mixture was quenched with H<sub>2</sub>O (0.8 mL), acidified to pH 1 with a solution of 1M HCl, then extracted with dichloromethane (4 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (dichloromethane /ethanol, 9/1, v/v) ; Yield : 77 %; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1378, 1455, 1579, 1600, 1700, 2852, 2927; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.86 (m, 3H), 1.13-1.25 (m, 6H), 1.36-1.51 (m, 5H), 1.68-1.75 (m, 2H), 3.80-3.90 (m, 1H), 4.23-4.38 (m, 2H), 6.18 (m, 1H), 7.50-7.57 (m, 2H), 7.65-7.68 (m, 1H), 7.84-7.86 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  18.3, 22.1, 24.5, 28.6, 29.9, 32.0, 32.5, 35.3, 68.4, 127.3, 128.6, 129.7, 129.9, 130.6, 132.8, 167.7, 167.8; HRMS for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> calc.: 309,1696; found: 309,1701.

### **2-(((4-Methyloct-7-en-1-yl)oxy)carbonyl)benzoic acid (24)**

To a solution of **(23)** (0.22 g, 1.54 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous pyridine (1.9 mL), phthalic anhydride (0.45 g, 3.1 mmol, 2 eq.) was added. The resulting mixture was heated at 130 °C for 18 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched with cold water (100 mL) and then extracted with dichloromethane (3 x 200 mL). The combined organic layers were washed with a solution of 10% HCl (2 x 100 mL) to remove pyridine. Finally, the organic layer was washed with a solution of 0.4M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (300 mL). The aqueous layer was acidified to pH 1 with a solution of 1M HCl and then extracted with dichloromethane (4 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (300 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane/TFA; 9/1/0.01; v/v). Yield : 58 %; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1074, 1124, 1284, 1411, 1452, 1491, 1599, 1580, 1639., 1697, 1727, 2916; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.87 (d, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 3H), 1.18-1.27 (m, 2H), 1.38-1.45 (m, 3H), 1.72-1.75 (m, 3H), 1.97-2.06 (m, 2H), 4.29 (t, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 2H), 4.86-4.91 (m, 1H), 4.94-4.99 (m, 1H), 5.73-5.80 (m, 1H), 7.54-7.62 (m, 2H), 7.69-7.71 (m, 1H), 7.90-7.92 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  19.4, 26.1, 31.4, 32.1, 33.1, 36.1, 66.6, 114.3, 129.0, 130.1, 130.2, 131.0, 132.3, 133.6, 139.3, 168.4, 172.0; HRMS for C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calc. : 291.1518; found : 291.1521.

### **2-(((8-Hydroxy-4-methyloctyl)oxy)carbonyl)benzoic acid (25)**

To a solution of **(24)** (0.05g, 0.171 mmol, 1 eq) dissolved in anhydrous THF, cooled at 0°C under argon atmosphere, B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> (0.004g, 0.172 mmol, 1eq) (1M in THF) was added dropwise. After stirring at room temperature for 2 h, excess of hydride was destroyed with H<sub>2</sub>O (0.007 mL). After 5 min, a solution of 3M NaOH (0.016 mL) and 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.016 mL) were successively added and the resulting mixture was heated at 50 °C for 1 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was extracted with diethyl ether (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 x 50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane, 5/5, v/v). Yield : 80%; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1452, 1491, 1601, 1639, 1697, 1727, 2916; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.85 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 3H), 1.10-1.51 (m, 13H), 1.68-1.76- (m, 2H), 3.57 (t, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 2H), 4.26 (t, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 2H), 7.30-7.34 (m, 1H), 7.38-7.40 (m, 1H), 7.45-7.49 (m, 1H), 7.93-7.95 (m, 1H); HRMS for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> calc. : 295.1831; found : 295.1841.

### **2-(((7-Carboxy-4-methylheptyl)oxy)carbonyl)benzoic acid (26) (7-cx-MMeOP)**

To a solution of **(25)** (0.03 g, 0.10 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous acetone, cooled at -20°C, Jones' reagent (1M, 0.1mL, 1 eq.) (freshly prepared from CrO<sub>3</sub> (6.7 g) in 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6 mL) and water (50 mL)) was added dropwise and stirred for 1 h. The precipitated reduced chromium salts were filtered off. The filtrate was quenched by water (30 mL), extracted with diethyl ether (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL). Methanol (10 mL) was added to eliminate the chromium (IV) salts residue. The organic layer was then washed with a solution of 0.4M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 mL). The aqueous layer was acidified to pH

1 with a solution of 3M HCl, then extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel (ethyl acetate/cyclohexane, 9/1, v/v). Yield : 77 %; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1430, 1587, 1630, 2924; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.85 (d, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 3H), 1.13-1.19 (m, 2H), 1.48-1.55 (m, 3H), 1.63-1.68 (m, 4H), 4.27 (t, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 2H), 7.33-7.50 (m, 2H), 7.58-7.63 (m, 1H), 7.84-7.95 (m, 1H); HRMS for C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> calc.: 323,1489; found: 323,1314.

## REFERENCE

Eljezi, T., Pinta, P., Richard, D., Pinguet, J., Chezal, J. M., Chagnon, M. C., Sautou, V., Grimandi, G., Moreau, E. 2017. In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line. *Chemosphere* 173, 452-459

# ANNEXE 3

## Annexe 3.1 Cahier d'observation pour un patient.



Date : 15/10/14  
 Jour d'étude : J1

Nom de l'enquêteur : Philippe . Nicot  
 Fonction : externe  
 Service : CCV

Volume d'urines collecté sur 24 heures : 3070 mL  
 Clairance à la créatinine (Cockcroft) : mL/min

450 mL débordé

### Recensement des situations cliniques

- DIALYSE (( HD  HF  HDF)       CEC  ECMO  ECLS  
 NUTRITION PARENTÉRALE       PLASMAPHÉRÈSE  
 NUTRITION ENTÉRALE

### Recensement des DMs utilisés : services Réa CCV et Chirurgie CCV

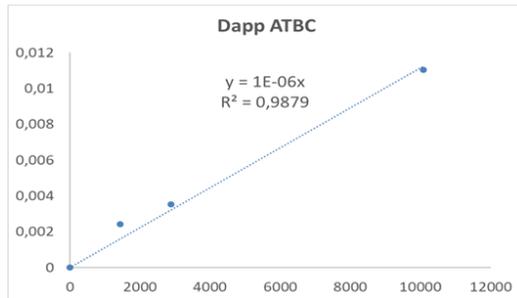
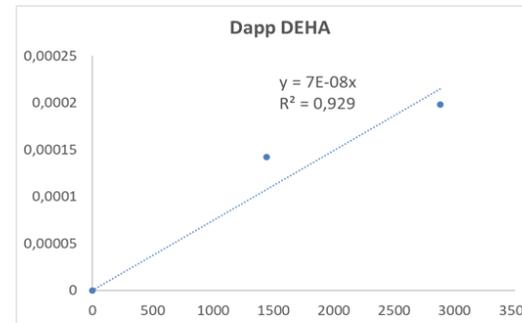
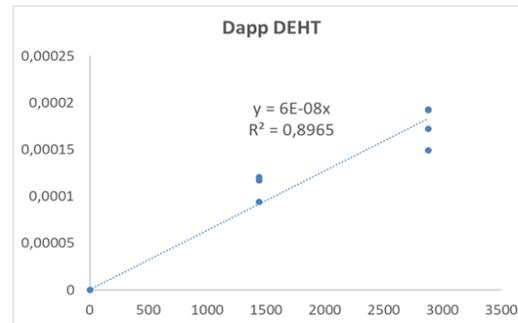
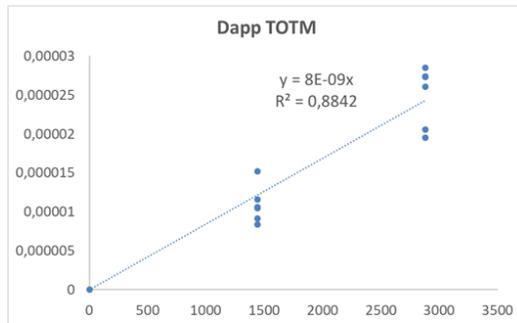
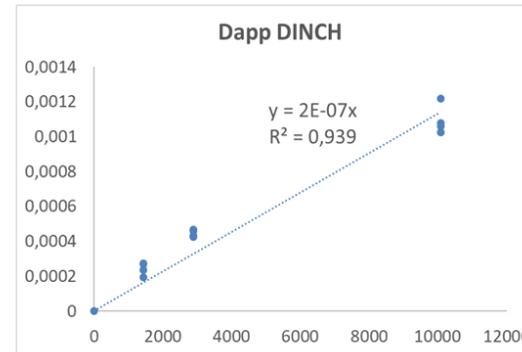
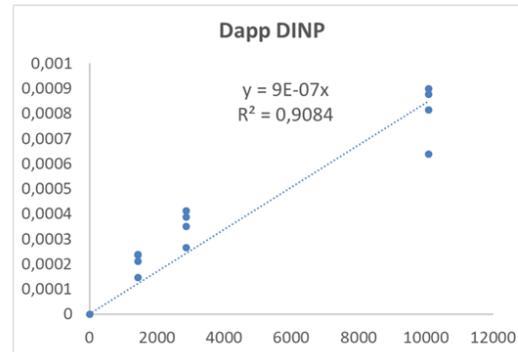
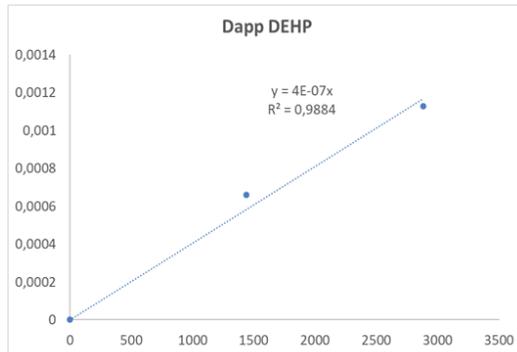
PERFUSEURS			
Modèle	Fournisseur	Heures de pose	Heures de retrait
<input checked="" type="checkbox"/> Perfusend L86-P (perfuseur simple) A64	SENDAL	<u>8 h 30</u>	<u>15 h 00</u>   <u>14 - 14 30</u>
<input type="checkbox"/> MS10 072810 (pompe Optima)	LÉPINE	<u>19 h 30 - 20 h x 2</u>	<u>23 h 02 - 10 - 23 h 30 - 31 30</u>
<input type="checkbox"/> Intrafix Primeline réf 4064101 (perfuseur avec R3V)	BBRAUN	<u>21 h 30 - 14 30</u>	<u>16 h 00 - 16 h 00 (J2)</u>
<input type="checkbox"/> Tubulure pour pompe IVAC (590-591-598) G59593	CAREFUSION	__ h __	__ h __
<input type="checkbox"/> Dosicair réf DF050 (régulateur de débit)	CAIR	__ h __	__ h __
TRANSFUSEURS			
<input checked="" type="checkbox"/> Transfusend réf VH22EGA (transfuseur simple)	SENDAL	<u>16 h 00</u>	<u>15 h 00</u>
PROLONGATEURS			
<input type="checkbox"/> Biocath opaque PO3115 (L150cm)	CAIR	__ h __	__ h __
Biocath PB31xxxM (∅ 1mm, bague mobile)	CAIR	<u>19 h 00 - 19 h 02</u>	__ h __
<input checked="" type="checkbox"/> 3105M		<u>9 h 00</u>	<u>15 h 00</u>   <u>21 h 30 - 21 h 30 (J2)</u>
<input checked="" type="checkbox"/> 3115M		<u>8 h 30</u>	<u>15 h 00</u>   <u>15 h - 15 h 30</u>
<input type="checkbox"/> Biocath PB3315M (∅ 2,5mm ; bague mobile)	CAIR	<u>14 h 30</u> →	<u>16 h 00 (J2)</u>
<input type="checkbox"/> Biocath PES3301M (∅ 2,5mm ; +R3V, bague mobile)	CAIR	__ h __	__ h __
<input type="checkbox"/> Biocath RPB3315A (+ rampe + R3V + supp intégré) L150cm	CAIR	__ h __	__ h __
<input checked="" type="checkbox"/> Biocath RPB4315 (+ rampe + R4V) L150cm	CAIR	<u>9 h 00</u>	<u>15 h 00</u>
<input type="checkbox"/> Biocath RPB5315A (+ rampe + R5V + supp intégré) L150cm	CAIR	__ h __	__ h __
<input type="checkbox"/> Aiguille de Huber + tubulure Polyperf réf 602009	PÉROUSE	__ h __	__ h __
DISPOSITIFS DE NUTRITION ENTÉRALE			
<input type="checkbox"/> Tubulure NE7005N (pompe P7000)	CAIR	__ h __	__ h __
<input type="checkbox"/> Tubulure NE9012H (gravité)	CAIR	__ h __	__ h __
DISPOSITIFS DE DIALYSE			
Lignes artério-veineuses			
<input type="checkbox"/> Aqualine (moniteur Aquarius)	BAXTER	__ h __	__ h __
<input type="checkbox"/> Aquaset 19 ligne + filtre HF19 (moniteur Aquarius)	BAXTER	__ h __	__ h __
<input type="checkbox"/> Prismaflex ST150 réf 83553573	HOSPAL	__ h __	__ h __
<input type="checkbox"/> Prismaflex Calcium CA150	HOSPAL	__ h __	__ h __
<input type="checkbox"/> Prisma SP420 réf 6033112	HOSPAL	__ h __	__ h __

CRF patient version 2 juin 2014

**Annexe 3.2 Concentrations des plastifiants dans le simulant (éthanol/eau ; 50/50 ; v / v) déterminées par GC-MS.**

	CAIR réf : PES 3301 M		Codan réf : E-87 P		CODAN réf : 43.4535		CAIR réf : PN 3301 N		CAIR réf : PN 3101 M		Sendal Prolonsend réf : Di 10 3 VG		Care Fusion réf : A64		Bbraun réf : 0086670 D		B BRAUN réf : 4063007		Doran international réf : INFU-R3		SLB MEDICAL réf : 41403	COVIDIEN Réf : 777015
Plastifiant	TOTM						DINCH				DINP				DEHT				DEHP		DEHA	ATBC
Volume de simulant (ml)	100	100	100	100	200	200	200	200	150	150	200	200	200	200	200	200	100	100	250		200	250
Diamètre interne (cm)	0,35	0,35	0,25	0,25	0,3	0,3	0,25	0,25	0,1	0,1	0,3	0,3	0,44	0,44	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3		0,4	0,3
Longueur (cm)	11,1	11,4	15	15	14,8	15,2	8,1	8,3	8,2	8,5	8,7	8,6	14,9	15	8,8	8,8	15,1	14,9	15,6		7,5	15
Surface interne (cm <sup>3</sup> )	12,20	12,53	11,78	11,78	13,94	14,32	6,36	6,51	2,57	2,67	8,19	8,10	20,59	20,73	8,29	8,29	9,48	9,36	14,70		9,42	14,13
Diamètre externe (cm <sup>3</sup> )	0,5	0,5	0,35	0,35	0,35	0,35	0,4	0,4	0,25	0,25	0,41	0,41	0,5	0,5	0,41	0,41	0,3	0,3	0,41		0,49	0,41
Surface externe (cm <sup>3</sup> )	17,4	17,90	16,49	16,49	16,27	16,71	10,17	10,43	6,44	6,67	11,20	11,07	23,40	23,56	11,33	11,33	14,23	14,04	20,09		11,54	19,32
Surface totale	29,640	30,44	28,27	28,27	30,22	31,03	16,54	16,94	9,01	9,34	19,40	19,18	44,00	44,29	19,62	19,62	23,71	23,40	34,79		20,97	33,45
Concentration du plastifiant (g/100g)	31,81	31,81	30,29	30,29	40,97	40,97	30,1	30,1	35,73	35,73	48,72	48,72	34,89	34,89	26,74	26,74	37,5	37,5	0,18		0,06	24,21
Concentration dans DM (g/mL)	0,40	0,40	0,38	0,38	0,52	0,52	0,38	0,38	0,45	0,45	0,61	0,61	0,44	0,44	0,33	0,33	0,47	0,47	0,002		0,00	0,30
Masse de l'échantillon (g)	1,02	1,04	0,45	0,46	1,05	1,08	0,78	0,80	0,39	0,41	0,72	0,71	1,14	1,15	0,82	0,82	1,09	1,08	1,34			
<b>Concentration en plastifiant relargué en fonction du temps de contact (µg/mL)</b>																						
1 jours	1,27	1,87	1,26	1,14	0,66	0,74	7,4	8,7	7,5	5,5	22,3	14,1	14,2	20,7	3,89	4,02		10,5	0,21		0,01	99,78
2 jours	3,31	3,54	2,86	3	1,54	1,67	14,8	14,1	12,6	12,1	23,4	24,5	26,1	34,6	6,45	6,44	19,6	16,8	0,36		0,01	145,20
7 jours	4,44	5,47	5,18	5,42	3,8	3,72	33,8	33,4	33,7	30,9	53,1	53,8	59	63,2	19,8	20,1	28,2	22,8	0,9			453,68
14 jours		5,35	5,35	5	5,55	5,3	74,8	54,4	47,4	54	75,1	77,9	80,04	77,5	27,1	24,7	22,7	22	1,12			
21 jours	5,98	4,87	4,79	4,86	5,53	5,65	62,2	58,5	55,5	57,3	80,5	83,6	76	82,7	26,7	27,2	22,1	19,7	1,16			
31 jours	4,42	4,09	3,96	4,95	5,18	5,66	60,5	62,2	56,8	55,5	83,8	85,7	82,6	77,7	25,8	26	19,7	22,8	1,1			

**Annexe 3.3 Les figures des coefficients de diffusion apparente ( $D_{app}$ ) de chaque plastifiant dans le PVC.**



### Annexe 3.4 Caractéristiques des DM utilisés dans le cadre de l'étude.

Nom du DM	Classe de DM	Plastifiant majoritaire	Quantité de plastifiant dans le DM en % (g/100g de PVC)							Surface du DM en contact avec le fluide (cm <sup>2</sup> )
			ATBC	DEHA	DEHP	DINCH	DEHT	DINP	TOTM	
Canules artérielles fémorales percutanées réf BEPALxxxx : 1723	CEC	ATBC	23,07	NQ	NQ		NQ		NQ	41
Canule d'aspiration intracardiaque gauche réf LVF18	CEC	DEHP			44,98					66
Canule cardioplégie antérograde double voies réf CA21V	CEC	DEHP		NQ	36,63					13
Canule de cardioplégie rétrograde avec ballonnet gonflable : gonflable manuellement réf 94913L	CEC	DEHP			31,92					43
Canules veineuses 3 étages : réf TF293702	CEC	DEHP			29,64		4,73			143
Canules veineuses 3 étages : réf TF364602	CEC	DEHP			29,64		4,73			192
Canule aortiques adultes : réf 82020	CEC	DEHP			37,63					53
Canule aortiques adultes : réf 82120	CEC	DEHP			37,63					53
Canule aortiques adultes : réf 77820	CEC	DINP		NQ	NQ			33,13		128
Canule aortiques adultes : réf 77418	CEC	DINP		NQ	NQ			33,13		57
Canule aortiques adultes : réf 77420	CEC	DINP		NQ	NQ			33,13		64
Canule aortiques pédiatriques : réf 82120	CEC	DEHP			37,63					53
Canules veineuses fémorales percutanées : BEPVS 2538	CEC	ATBC	23,07							99
Canules veineuses armées angle DT : réf 69328	CEC	DINP			NQ			36		104
Canules veineuses armées angle DT : réf 69331	CEC	DINP			NQ			36		115

Nom du DM	Classe de DM	Plastifiant majoritaire	Quantité de plastifiant dans le DM en % (g/100g de PVC)							Surface du DM en contact avec le fluide (cm <sup>2</sup> )
			ATBC	DEHA	DEHP	DINCH	DEHT	DINP	TOTM	
Canules veineuses armées angle DT : réf 69428	CEC	DINP			NQ			36		104
Canules veineuses armées angle DT : réf 69431	CEC	DINP			NQ			36		115
Canules veineuses 3 étages : réf TF292902	CEC	DEHP			29,64		4,73			192
Canules veineuses 3 étages : réf TF293702	CEC	DEHP			29,64		4,73			143
Canules veineuses 3 étages : réf TF364602	CEC	DEHP			29,64		4,73			192
Circuit BEHQV21607 BIOLINE	CEC	DEHP			37,6					7690
Circuit 3/8-3/8 réf IN00116	CEC	DEHP			33,62					5334
Ligne d'aspiration 04137	R	DEHP			37,74					68,82
Set tirette (drains cgir cardiaque) : réf 79026 (adulte)	R	DEHP			29,8					15
Set tirette (drains cgir cardiaque) : réf 79005 (ped)	R	DEHP			27,98		0,14			4,2
Tubulure NE7005N (pompe P7000)	NE	DINCH			NQ	32,6				245
Perfusend L86-P (perfuseur simple) A64	NPP	DINP						34,39		137
MS10 072810 (pompe Optima)	NPP	TOTM							38,1	254
Intrafix Primeline réf 4064101 (perfuseur avec R3V)	NPP	DEHT					43,82			169
Tubulure pour pompe IVAC (590-591-598) G59593	NPP	TOTM							36,45	254
Dosicair réf DF050 (régulateur de débit)	NPP	DINCH			NQ	33,05				27
Biocath opaque PO3115 (L150cm)	NPP	DINCH				29,34			3,92	47
Biocath PB31xxxM (ø 1mm, bague mobile) : 3105M	NPP	TOTM			NQ		0,35		30,01	47
Biocath PB31xxxM (ø 1mm, bague mobile) : 3115M	NPP	TOTM			NQ		0,43		28,79	47,1

Nom du DM	Classe de DM	Plastifiant majoritaire	Quantité de plastifiant dans le DM en % (g/100g de PVC)							Surface du DM en contact avec le fluide (cm <sup>2</sup> )
			ATBC	DEHA	DEHP	DINCH	DEHT	DINP	TOTM	
Biocath PB3315M (ø 2,5mm ; bague mobile)	NPP	TOTM			NQ		0,59		30,01	118
Biocath PES3301M (ø 2,5mm; +R3V, bague mobile)	NPP	TOTM			NQ		0,43		30,03	10,6
Biocath RPB3315A (+ rampe + R3V + supp intégré)	NPP	TOTM							28,06	118
Biocath RPB4315 (+ rampe + R4V) L150cm	NPP	TOTM			NQ		NQ		30,18	47
Biocath RPB5315A (+ rampe + R5V + supp intégré)	NPP	TOTM							31,12	118
Bicakcilar : 19014 011	R	DEHP			30,61					55
Capteur de pression Vigileo Flotrac réf MHD8R	R	DEHP			26,59		0,42			24
KT de mesure de pression Swann-Ganz + SV02 + EDV réf 774HF75	R	DEHA		20,47	NQ		NQ		0,26	62
Capteur de pression artérielle réf T100215A	R	DEHP			26,26					286
Taperguard EVAC (non armées avec ballonnet) : 18870 (ø 7mm)	OX	DEHP			24,53					73
Taperguard EVAC (non armées avec ballonnet) : 18875 (ø 7,5mm)	OX	DEHP			24,53					82
Sondes non armées avec ballonnet (non préformées) réf 1124800xx : 70	OX	DEHP			33,25					70
Sondes non armées avec ballonnet (non préformées) réf 1124800xx : 75	OX	DEHP			33,25					78
Sondes non armées avec ballonnet (non préformées) réf 1124800xx : 80	OX	DEHP			33,25					85
Raccord annelé (KT mount) pour circuit de ventilation 22F réf 5120	R	TOTM					0,16		42,06	24
réf 1103	OX	DEHT					23,9			23,1

Nom du DM	Classe de DM	Plastifiant majoritaire	Quantité de plastifiant dans le DM en % (g/100g de PVC)							Surface du DM en contact avec le fluide (cm <sup>2</sup> )
			ATBC	DEHA	DEHP	DINCH	DEHT	DINP	TOTM	
Masque haute concentration : réf 1102	OX	DEHT			NQ		23,9			231
Masque haute concentration : réf 1135	OX	DEHP			23,37					231
Masque pour nébulisation réf 145 3003	OX	DEHP			24,59					231
Transfusend réf VH22EGA (transfuseur simple)	T	DINP						35,76		170
Poche de réinjection de sang pour X-TRA réf 04268	T	DEHP			38,25					38,7
Kit d'autotransfusion complet ELECTA : 04170M (Electa 225)	T	DEHP			40,25		0,14			331,55
Kit de recueil d'autotransfusion pour X-TRA réf 04051	T	DEHP			36,01					220,9
Kit lavage autotransfusion X-TRA pr ELECTA réf 0465M	T	DEHP			56,14		0,14			110,7
Poche de transfert de sang X-TRA 1L réf 04132	T	DEHP			36,34					34,55
BIOCATH PB3118M	NPP	TOTM			NQ		0,95		30,87	56,55
CANULE AORTIQUE 82120	CEC	DEHP			39,05					43
CANULE AORTIQUE 89120	CEC	DEHP			37,63					43
CANULE AORTIQUE DLP20	CEC	DEHP			39,05					57,81
CANULE AORTIQUE MEDTRONIC 77420	CEC	DINP						33,13		64
CANULE AORTIQUE MEDTRONIC 82122	CEC	DEHP			37,63					58
CANULE ARTERIELLE MEDTRONIC 20FR	CEC	ATBC	23,07							43
CANULE DE CARDIOPLEGIE MEDTRONIC 21012	CEC	DEHP			36,63					13
CANULE DE CARDIOPLEGIE RETROGRADE 34885	CEC	DEHP			31,92					85,92
CANULE DE CARDIOPLEGIE RETROGRADE 94913	CEC	DEHP			31,92					43
CANULE DE CARDIOPLEGIE RETROGRADE 94995	CEC	DEHP			31,92					50

Nom du DM	Classe de DM	Plastifiant majoritaire	Quantité de plastifiant dans le DM en % (g/100g de PVC)							Surface du DM en contact avec le fluide (cm <sup>2</sup> )
			ATBC	DEHA	DEHP	DINCH	DEHT	DINP	TOTM	
CANULE MEDOS 3900	CEC	TOTM							45,05	26
CANULE MEDOS 4135	CEC	TOTM							45,05	26
CANULE MEDOS MEP 1140	CEC	TOTM							45,05	26
CANULE MEDOS MEP 1199	CEC	TOTM							45,05	26
CANULE MEDOS MEP 2130	CEC	TOTM							45,05	26
CIRCUIT CEC IN00087	CEC	DEHP			33,29					4510
CIRCUIT CEC IN00116	CEC	DEHP			33,62					5334
CIRCUIT MEDTRONIC M337703	CEC	DEHP		3,86	34,03					4585
CIRCUIT RESPIRATEUR 5009003	OX	TOTM			NQ		0,23		48,33	1105
ECHANGEUR THERMIQUE SORIN P3740	CEC	DEHP			32,51					113,1
KIT AUTOTRANSFUSION X-TRA	T	DEHP			40,25		0,14			3535
MASQUE OXYGENE 1181015	OX	DEHT					23,3			230,91
PCA VYGON 7301	NPP	TOTM			NQ		0,14		33,12	59
PCA VYGON 7301 PERFUSEND A64 BP 3115M	NPP	TOTM			NQ		0,14		33,12	243
PERFUSEUR INFU-R3 INFU 1-X DORAN	NPP	DINCH			NQ	44,28				184
SONDE RUSH 112480	OX	DEHP			25,05					78
SOUFFLETTE MAQUET CB1000	OX	TOTM	0,54						40,94	418
TRACHEOFLEX 18770	OX	DEHP			24,53					238
TUBULURE Z072810F	NPP	TOTM							38,1	254

**Annexe 3.5.1 Dose d'exposition à chaque plastifiant estimée ( $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ ) comparée aux valeurs toxicologiques de référence DJT (dose journalière tolérable). Les valeurs indiquées en rouge dépassent la valeur de DJT.**

**Annexe 3.5.2 Exposition des patients aux plastifiants (majoritaires et minoritaires) lors du premier jour d'hospitalisation (J1).**

ATBC	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de ATBC en mg/j (mediane)	Dose estimée de ATBC reçue par le patient en $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max ( $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ ) min ( $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ )	DJT du ATBC ( $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ )
TOTAL	66	3	0	0	9,97 0	125,42 0	1000
CEC	66	2	0	0	9,97 0	125,42 0	1000
NE	66	0	0	0	0 0	0 0	1000
NPP	66	1	0	0	0 0	0 0	1000
OX	66	1	0	0	0,30 0	3,71 0	1000
R	66	0	0	0	0 0	0 0	1000
T	66	0	0	0	0 0	0 0	1000

DEHA	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de DEHA en mg / j (mediane)	Dose estimée de DEHA reçue par le patient en $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max ( $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ ) min ( $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ )	DJT du DEHA ( $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ )
TOTAL	66	11	0	0	3,13 0	39,42 0	300
CEC	66	10	0	0	3,13 0	39,42 0	300
NE	66	0	0	0	0 0	0 0	300
NPP	66	0	0	0	0 0	0 0	300
OX	66	0	0	0	0 0	0 0	300
R	66	1	0	0	0,20 0	2,61 0	300
T	66	0	0	0	0 0	0 0	300

DEHP	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de DEHP en mg / j (mediane)	Dose estimée de DEHP reçue par le patient en $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max ( $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ ) min $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ )	DJT du DEHP ( $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ )
TOTAL	66	66	189,39	<b>2382,27</b>	628,59 3,77	<b>7906,87</b> 47,37	50
CEC	66	63	96,79	<b>1217,44</b>	455,54 0	<b>5730,15</b> 0	50
NE	66	0	0	0	0,00 0	0 0	50
NPP	66	0	0	0	0 0	0 0	50

OX	66	56	4,43	55,66	41,97 0	527,89 0	50
R	66	51	11,27	141,77	67,93 0	854,43 0	50
T	66	39	10,00	125,77	197,108 0	2479,34 0	50

DEHT	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de DEHT en mg / j (mediane)	Dose estimée de DEHT reçue par le patient en µg / kg / j (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max (µg / kg / j) min (µg / kg / j)	DJT du DEHT (µg / kg / j)
TOTAL	66	66	0,13	1,64	6,90 0,02	86,87 0,25	3950
CEC	66	48	0,04	0,54	0,13 0	1,69 0	3950
NE	66	0	0	0	0 0	0 0	3950
NPP	66	66	0,03	0,49	2,62 0	32,97 0,03	3950
OX	66	15	0	0	4,2 0	52,82 0	3950
R	66	4	0	0	0,01 0	0,13 0	3950
T	66	33	0	0	0,09 0	1,21 0	3950

DINCH	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de DINCH en mg / j (mediane)	Dose estimée de DEHP reçue par le patient en µg / kg / j (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max (µg / kg / j) min (µg / kg / j)	DJT du DINCH (µg / kg / j)
TOTAL	66	47	3,35	42,22	30,05 0	377,93 0	400
CEC	66	0	0	0	0 0	0 0	400
NE	66	2	0	0	30,05 0	377,93 0	400
NPP	66	45	3,35	42,22	8,54 0	107,48 0	400
OX	66	0	0	0	0 0	0 0	400
R	66	0	0	0	0 0	0 0	400
T	66	0	0	0	0 0	0 0	400

DINP	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de DINP en mg / j (mediane)	Dose estimée de DEHP reçue par le patient en µg / kg / j (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max (µg / kg / j) min (µg / kg / j)	DJT du DINP (µg / kg / j)
TOTAL	66	66	82,82	1041,75	187,40 18,68	2357,34 234,97	150
CEC	66	26	0	0	32,04 0	403,03 0	150
NE	66	0	0	0	0 0	0 0	150
NPP	66	66	80,48	1012,28	80,48 15,08	1012,28 0	150
OX	66	0	0	0	0 0	0 0	150
R	66	0	0	0	0 0	0 0	150
T	66	51	2,16	27,21	103,84	1306,15	150

					0	0	
--	--	--	--	--	---	---	--

TOTM	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de DEHP en mg / j (mediane)	Dose estimée de TOTM reçue par le patient en µg / kg / j (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max (µg / kg / j) min (µg / kg / j)	DJT du TOTM (µg / kg / j)
TOTAL	66	66	0,56	7,03	3,12 0,03	39,22 0,38	1130
CEC	66	6	0	0	0,06 0	0,75 0	1130
NE	66	0	0	0	0 0	0 0	1130
NPP	66	66	0,49	6,18	2,45 0,75	30,85 9,43	1130
OX	66	10	0	0	2,46 0	30,99 0	1130
R	66	3	0	0	0,03 0	0 0	1130
T	66	0	0	0	0,04 0	0,48 0	1130

**Annexe 5.2. Exposition journalière moyenne des patients aux plastifiants (majoritaires et minoritaires) pendant leur hospitalisation.**

ATBC	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de ATBC en mg / j (mediane)	Dose estimée de ATBC reçue par le patient en µg / kg / j (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max (µg / kg / j) min (µg / kg / j)	DJT du ATBC (µg / kg / j)
TOTAL	244	31	0	0	1,66 0	20,90 0	1000
CEC	244	9	0	0	1,66 0	20,90 0	1000
NE	244	0	0	0	0 0	0 0	1000
NPP	244	0	0	0	0 0	0 0	1000
OX	244	22	0	0	0,15 0	1,85 0	1000
R	244	0	0	0	0 0	0 0	1000
T	244	0	0	0	0 0	0 0	1000

DEHA	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de DEHA en mg / j (mediane)	Dose estimée de DEHA reçue par le patient en µg / kg / j (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max (µg / kg / j) min (µg / kg / j)	DJT du DEHA (µg / kg / j)
TOTAL	244	32	0	0	1,57 0	19,71 0	300
CEC	244	26	0	0	1,57 0	19,71 0	300
NE	244	0	0	0	0,00 0	0 0	300
NPP	244	0	0	0	0,00 0	0 0	300
OX	244	0	0	0	0,00 0	0 0	300

					0	0	
R	244	6	0	0	0,03 0	0,43 0	300
T	244	0	0	0	0,00 0	0 0	300

DEHP	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de DEHP en mg / j (mediane)	Dose estimée de DEHP reçue par le patient en µg / kg / j (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max µg / kg / j) min (µg / kg / j)	DJT du DEHP (µg / kg / j)
TOTAL	244	244	69,58	875,22	202,24 0,63	2543,95 7,89	50
CEC	244	229	25,16	316,53	182,76 0	2298,81 0	50
NE	244	0	0	0	0 0	0	50
NPP	244	0	0	0	0 0	0	50
OX	244	207	1,66	20,91	37,60 0	472,90 0	50
R	244	211	7,45	93,71	110,98 0	1395,95 0	50
T	244	139	1,09	13,69	153,31 0	1928,37 0	50

DEHT	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de DEHT en mg / j (mediane)	Dose estimée de DEHT reçue par le patient en µg / kg / j (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max (µg / kg / j) min (µg / kg / j)	DJT du DEHT (µg / kg / j)
TOTAL	244	244	0,16	2,04	7,98 0,03	100,38 0,32	3950
CEC	244	159	0,01	0,13	0,07 0	0,85 0	3950
NE	244	0	0	0	0 0	0	3950
NPP	244	244	0,13	1,63	7,97 0	100,20 0,02	3950
OX	244	59	0	0	1,75 0	22,00 0,02	3950
R	244	17	0	0	0,01 0	0,09 0,02	3950
T	244	112	0	0	0,08 0	0,94 0,02	3950

DINCH	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de DINCH en mg / j (mediane)	Dose estimée de DEHP reçue par le patient en µg / kg / j (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max (µg / kg / j) min (µg / kg / j)	DJT du DINCH (µg / kg / j)
TOTAL	244	220	2,45	30,86	62,69 0	788,59 0	400
CEC	244	0	0	0	0 0	0	400
NE	244	20	0	0	30,05 0	377,93 0	400
NPP	244	220	2,31	29,02	32,65 0	410,66 0	400
OX	244	0	0	0	0 0	0	400
R	244	0	0	0	0,00	0	400

					0	0	
T	244	0	0	0	0,00 0	0 0	400

DINP	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de DINP en mg / j (mediane)	Dose estimée de DEHP reçue par le patient en µg / kg / j (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max (µg / kg / j) min (µg / kg / j)	DJT du DINP (µg / kg / j)
TOTAL	244	244	372,32	4683,30	2328,25 4,73	29286,15 59,53	150
CEC	244	98	0	0	7,55 0	94,90 0	150
NE	244	0	0	0	0 0	0 0	150
NPP	244	244	371,78	4676,50	2325,98 4,19	29257,57 52,72	150
OX	244	0	0	0	0 0	0 0	150
R	244	0	0	0	0 0	0 0	150
T	244	209	0,72	9,07	40,38 0	507,94 0	150

TOTM	Nombre total de patients	Nombre de patients ayant eu la prise en charge	Dose de DEHP en mg / j (mediane)	Dose estimée de TOTM reçue par le patient en µg / kg / j (médiane)	max (mg / j) min (mg / j)	max (µg / kg / j) min (µg / kg / j)	DJT du TOTM (µg / kg / j)
TOTAL	244	244	1,31	16,41	13,23 0	166,41 0	1130
CEC	244	20	0	0	0,03 0	0,37 0	1130
NE	244	0	0	0	0 0	0 0	1130
NPP	244	244	1,29	16,17	13,23 0,02	166,41 0	1130
OX	244	30	0	0	0,76 0	9,59 0	1130
R	244	13	0	0	0,01 0	0,16 0	1130
T	244	0	0	0	0 0	0 0	1130