



HAL
open science

Les plastifiants dans les gants à usage professionnel : de l'analyse de leur composition à l'évaluation de leur toxicité endothéliale par une approche in vitro

Kelly Poitou

► To cite this version:

Kelly Poitou. Les plastifiants dans les gants à usage professionnel : de l'analyse de leur composition à l'évaluation de leur toxicité endothéliale par une approche in vitro. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR036 . tel-04043915

HAL Id: tel-04043915

<https://theses.hal.science/tel-04043915>

Submitted on 24 Mar 2023

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Les plastifiants dans les gants à usage professionnel : de l'analyse de leur composition à l'évaluation de leur toxicité endothéliale par une approche in vitro

Présentée et soutenue par
KELLY POITOU

**Thèse soutenue le 11/07/2022
devant le jury composé de**

M. SYLVAIN BILLET	MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE LITTORAL COTE D'OPALE	Rapporteur du jury
M. JEAN-FRANCOIS GOOSSENS	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE DE LILLE	Rapporteur du jury
MME TIPHAINE ROGEZ-FLORENT	MAITRE DE CONFERENCES, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
MME VALERIE SAUTOU	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE CLERMONT AUVERGNE	Membre du jury
MME MARIE LECOEUR	MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE DE LILLE	Président du jury
MME CHRISTELLE MONTEIL	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par CHRISTELLE MONTEIL (Aliments bioprocédés toxicologie environnements)

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit est le fruit de mes travaux de thèse menés au sein de l'UR 4651 ABTE -ToxEMAC (Toxicologie de l'Environnement, Milieux Aériens et Cancers) à l'Université de Rouen Normandie.

Je remercie tout d'abord l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (ED nBISE) pour m'avoir accordé le financement de ma thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de juger ce travail. J'adresse mes profonds remerciements au Professeur Jean-François Goossens et au Docteur Sylvain Billet pour avoir accepté d'être rapporteurs. Je suis honorée que le Docteur Marie Lecoeur et le Professeur Valérie Sautou aient accepté d'être examinatrices, et je tiens à leur adresser mes sincères remerciements pour le temps qu'elles m'ont consacré en s'investissant dans mon comité de suivi individuel.

Je remercie sincèrement le Professeur Christelle Monteil, ma directrice de thèse, pour le temps qu'elle a consacré à l'encadrement de ma thèse, pour les échanges fructueux et constructifs, pour ses conseils éclairants et son enthousiasme communicatif au sujet de la mitochondrie.

Je remercie profondément le Docteur Tiphaine Rogez-Florent, ma co-encadrante de thèse, pour son investissement, ses conseils, sa grande disponibilité et son optimisme. Je lui suis reconnaissante du temps qu'elle m'a accordé durant toutes ces années depuis mon arrivée au laboratoire et pour avoir apporté des réponses à mes interrogations.

Je remercie chaleureusement le Docteur Cécile Corbière pour son encadrement scientifique, sa grande implication, son aide et ses conseils, le temps qu'elle m'a consacré et aussi pour m'avoir initiée à la culture cellulaire.

Je souhaite remercier le Professeur Jean-Marie Vaugeois pour sa bienveillance et sa bonne humeur communicative.

Je remercie bien évidemment le Professeur Philippe Vérité pour ses nombreux conseils et sa sympathie.

Je remercie bien entendu tous les autres membres du laboratoire : Violaine, Ana, Clémence M., Albana, Clémence B., Margueritta que j'ai eu la chance de côtoyer. Merci pour avoir su créer un climat de bonne entente et de convivialité, je vous adresse ma profonde sympathie. Aussi, je remercie vivement Christel et Cathy. Bien évidemment, je n'oublie pas de remercier les stagiaires. Je tiens à remercier Anaïs D. pour son enthousiasme, ses encouragements et qui a fait preuve d'implication dans le projet. Merci également à Louise qui m'a prêté main forte quand cela a été nécessaire.

Je tiens à adresser mes remerciements au Professeur Catherine Foulon et au Docteur Cécile Danel pour leur participation à ce projet. Je vous fais part de ma reconnaissance.

Je remercie bien évidemment Carole, Edwige, Najla, Sophie, Anaïs L. et toutes les personnes qui ont rendu cette expérience agréable.

Enfin, un grand merci à ma famille et à mes proches pour leur soutien inconditionnel.

TABLE DES MATIÈRES

Communications scientifiques	I
Liste des figures	III
Liste des tableaux	V
Liste des abréviations et acronymes	VII
Avant-propos	11
Chapitre 1 – Les plastifiants	15
1. Généralités	17
1.1. L'ère du plastique	17
1.2. Les additifs de la matière plastique	18
1.3. Les plastifiants	18
1.3.1. Marché des plastifiants	20
1.3.2. Classifications des plastifiants	21
1.3.3. Considérations pour la plastification externe	22
2. Principaux plastifiants	24
2.1. Hydrocarbures aromatiques	24
2.1.1. Les esters de l'acide phtalique	24
2.1.2. Benzoates et dérivés	27
2.1.3. Trimellitates	28
2.2. Hydrocarbures aliphatiques cycliques : cyclohexanoates	28
2.3. Hydrocarbures aliphatiques acycliques	29
2.3.1. Les esters de l'acide aliphatique dicarboxylique	29
2.3.2. Citrates	31
3. Propriétés physico-chimiques des plastifiants	33
Chapitre 2 – Multi-exposition aux plastifiants et méthodes d'analyse	37
1. Contexte de multi-exposition	39
1.1. Voie orale	40
1.1.1. Apports alimentaires	40
1.1.2. Apports non alimentaires	43
1.2. Voie respiratoire	44

1.2.1. Air extérieur	44
1.2.2. Air intérieur	45
1.3. Exposition par voie injectable	47
1.4. Voie cutanée	48
1.4.1. Produits cosmétiques et d'hygiène corporelle.....	49
1.4.2. Gants de protection.....	50
2. Méthodes d'analyse	51
2.1. Techniques extractives pour la préparation des échantillons	52
2.1.1. Techniques classiques d'extraction.....	52
2.1.2. Techniques d'extraction alternatives.....	58
2.2. Méthodes d'identification et de quantification.....	67
2.2.1. Méthodes d'analyse directes	67
2.2.2. Méthodes d'analyse indirectes par couplage avec la chromatographie de partage	69
2.2.3. Modes de détection.....	73
2.2.4. Performances analytiques.....	77
2.2.5. Sources de contamination externe et contrôles analytiques.....	78
Chapitre 3 – Conséquences sanitaires des expositions aux plastifiants	83
1. Données pharmacocinétiques	85
1.1. Phase d'absorption	86
1.1.1. Paramètres liés aux propriétés physico-chimiques des plastifiants.....	86
1.1.2. Paramètres liés à la voie d'exposition	87
1.2. Phase de distribution	90
1.3. Phase de métabolisation	91
1.3.1. Métabolisation cutanée.....	93
1.3.2. Métabolisation hépatique	94
1.4. Phase d'élimination	96
2. Effets des plastifiants sur la santé.....	98
2.1. Effets sur le système reproducteur	98
2.2. Effets au niveau hépatique	101
2.3. Effets au niveau rénal.....	102
3. Effets sur le système cardiovasculaire.....	103
3.1.1. Effets cardiaques	104
3.1.2. Effets au niveau vasculaire.....	105
4. Aspects réglementaires.....	109

Objectifs	113
Matériels et méthodes	119
1. Partie expérimentale en chimie analytique	121
1.1. Matériels	121
1.1.1. Sources de contamination externes et contrôles analytiques	121
1.1.2. Échantillonnage de gants	121
1.1.3. Sélection des plastifiants d'intérêt	121
1.1.4. Solutions standards et solvants	122
1.1.5. Préparation des solutions mères	122
1.1.6. Systèmes analytiques	122
1.1.7. Validation des méthodes analytiques	123
1.2. Méthodes	123
1.2.1. Conditions opératoires optimisées en GC-MS	123
1.2.2. Conditions opératoires optimisées en HPLC-DAD	125
1.2.3. Procédure d'extraction des plastifiants appliquée aux gants	126
1.2.4. Validation des méthodes analytiques	127
2. Partie expérimentale en biologie cellulaire	130
2.1. Matériels	130
2.1.1. Modèle cellulaire	130
2.1.2. Milieu de culture, réactifs et solvants	130
2.1.3. Consommables	131
2.1.4. Appareillages	132
2.2. Méthodes	132
2.2.1. Plastifiants étudiés	132
2.2.2. Préparation des solutions de plastifiants	132
2.2.3. Conditions de culture cellulaire	133
2.2.4. Protocole pour évaluer <i>in vitro</i> la toxicité endothéliale des plastifiants	134
2.2.5. Mesure de la viabilité cellulaire	135
2.2.6. Dosage du glutathion et des adénosines phosphates	136
2.2.7. Évaluation de la fonction mitochondriale	139
2.2.8. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	140
2.2.9. Analyses statistiques	140
Résultats	141
Article 1	143
Article 2	165

Discussion générale	193
Conclusions et perspectives	205
Références bibliographiques	211
Annexes	241
Annexe I : Répartition des plastifiants en pourcentage de la dose appliquée au niveau cutané	243
Annexe II : Récapitulatif des mesures réglementaires en vigueur pour les plastifiants.....	244
Annexe III : Caractéristiques des plastifiants étudiés	246
Annexe IV : Tableau regroupant les propriétés physico-chimiques, la classification CMR et les quantités enregistrées pour chaque plastifiant	247
Annexe V : Paramètres de validation HPLC pour les adénosines phosphates cellulaires .	250

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

Kelly Poitou, Tiphaine Rogez-Florent, Marie Lecoœur, Cécile Danel, Romain Regnault, Philippe Vérité, Christelle Monteil, Catherine Foulon. **Analysis of Phthalates and Alternative Plasticizers in Gloves by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Liquid Chromatography–UV Detection: A Comparative Study.** *Toxics*. 2021; 9(9): 200. doi: 10.3390/toxics9090200

Kelly Poitou, Tiphaine Rogez-Florent, Anaïs Dirninger, Cécile Corbière, Christelle Monteil. **Effects of DEHP, DEHT and DINP alone or in a mixture on cell viability and mitochondrial metabolism of endothelial cells *in vitro*.** *Toxics*. 2022; 10(7): 373. doi: 10.3390/toxics10070373

Communications orales

Kelly Poitou, Tiphaine Rogez-Florent, Cécile Corbière. **Étude des plastifiants présents dans les gants à usage professionnel et mise en place d'un modèle d'étude de toxicité endothéliale.** Journée scientifique du Réseau de recherche régional sécurité sanitaire, bien-être et aliments durables (SÉSAD), Évreux, France. Décembre 2018

Kelly Poitou, Cécile Corbière, Tiphaine Rogez-Florent, Christelle Monteil. **Transcutaneous exposure to phthalates from professional protective gloves and evaluation of their vascular toxicity.** Journées de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (ED nBISE), Caen, France. Mars 2019

Kelly Poitou, Christelle Monteil, Tiphaine Rogez-Florent. **Development and validation of a gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) method for identification and quantification of plasticizers in protective gloves.** 10th Young Environmental Scientists Meeting, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe, En ligne. Février 2021

Kelly Poitou, Tiphaine Rogez-Florent, Christelle Monteil, Cécile Corbière. **Étude des effets *in vitro* de plastifiants entrant dans la composition des gants à usage professionnel sur un modèle de cellules endothéliales microvasculaires.** Webinaire de la Société de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire (STCM), En ligne. Septembre 2021

Kelly Poitou, Cécile Corbière, Tiphaine Rogez-Florent, Christelle Monteil. **Les plastifiants dans les gants à usage professionnel : de l'analyse de leur composition à l'évaluation de leur toxicité endothéliale par une approche *in vitro***. Journée scientifique du Réseau de recherche régional sécurité sanitaire, bien-être et aliments durables (SÉSAD), Saint-Étienne-du-Rouvray. Novembre 2021

Communications affichées

Kelly Poitou, Philippe Vérité, Cécile Corbière, Christelle Monteil, Tiphaine Rogez-Florent. **Identification des plastifiants présents dans les gants à usage professionnel par une approche associant l'extraction par des solvants organiques et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse**. Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l'AFSEP (SEP), Paris, France. Mars 2019

Kelly Poitou, Cécile Corbière, Christelle Monteil, Tiphaine Rogez-Florent. **Evaluation of plasticizers from protective gloves: determination of the content of plasticizers in vinyl gloves and *in vitro* toxicity studies on microvascular endothelial cells**. Journées de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (ED nBISE), En ligne. Mai 2021

Kelly Poitou, Cécile Corbière, Christelle Monteil, Tiphaine Rogez-Florent. **Evaluation of plasticizers from protective gloves: determination of the content of plasticizers in vinyl gloves and *in vitro* toxicity studies on microvascular endothelial cells**. Congrès de la fédération EUROTOX (Federation of European Toxicologists and European Societies of Toxicology), En ligne. Septembre 2021

Kelly Poitou, Tiphaine Rogez-Florent, Marie Lecoœur, Cécile Danel, Romain Regnault, Philippe Vérité, Christelle Monteil, Catherine Foulon. **Analyse simultanée de treize plastifiants d'intérêt par GC-MS et HPLC-DAD pour la caractérisation de gants à usage professionnel**. Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l'AFSEP (SEP), Paris, France. Octobre 2021

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma représentant les trois théories de la plastification.....	19
Figure 2 : Structure chimique du PVC	21
Figure 3 : Structure chimique commune aux phtalates	25
Figure 4 : Structures chimiques des principaux phtalates cités	25
Figure 5 : Structures chimiques des téréphtalates (structure commune et DEHT).....	26
Figure 6 : Structure chimique commune aux benzoates.....	27
Figure 7 : Structure chimique commune aux dibenzoates.....	27
Figure 8 : Structures chimiques des principaux benzoates cités.....	27
Figure 9 : Structures chimiques des trimellitates (structure commune et TOTM).....	28
Figure 10 : Structure chimique commune aux cyclohexanoates	29
Figure 11 : Structures chimiques des principaux cyclohexanoates cités.....	29
Figure 12 : Structure chimique commune aux esters de l'acide aliphatique dicarboxylique	30
Figure 13 : Structures chimiques des principaux adipates cités	30
Figure 14 : Structures chimiques des principaux azélates cités.....	31
Figure 15 : Structures chimiques des principaux sébaçates cités	31
Figure 16 : Structure chimique commune aux citrates	32
Figure 17 : Structures chimiques des principaux citrates cités.....	32
Figure 18 : Illustration des interactions entre le PVC et la fonction ester du plastifiant.....	33
Figure 19 : Schéma représentant l'interaction entre le DEHP et le PVC	34
Figure 20 : Influence des propriétés physico-chimiques des plastifiants sur la plastification.....	35
Figure 21 : Contexte de multi-exposition aux plastifiants.....	39
Figure 22 : Illustration du principe de l'extraction liquide-liquide	53
Figure 23 : Illustration du principe de l'extraction par la technique QuEChERS.....	54
Figure 24 : Illustration du principe d'extraction par la méthode Soxhlet.....	56
Figure 25 : Illustration du principe de la SPE.....	57
Figure 26 : Illustration du principe de l'ASE	59
Figure 27 : Illustration du principe de la DLLME.....	60
Figure 28 : Illustration des deux configurations de la seringue utilisée pour la MEPS.....	61
Figure 29 : Illustration du principe de la micro-extraction par TD	63
Figure 30 : Illustration des deux modes de prélèvement par SPME.....	64
Figure 31 : Illustration du barreau d'extraction utilisé en HSSE et en SBSE	65
Figure 32 : Représentation générale du diagramme de phases d'un corps pur	72
Figure 33 : Illustration des analyseurs de masse	76
Figure 34 : Schéma illustrant les étapes pharmacocinétiques pour les plastifiants	85

Figure 35 : Formation des métabolites régiosélectifs du TOTM (réactions de phase I)	94
Figure 36 : Schéma général de métabolisation des plastifiants (cas des phtalates).....	95
Figure 37 : Métabolites secondaires formés au cours des réactions de phase II (exemple avec le DEHP)	96
Figure 38 : Mécanisme d'action général des récepteurs nucléaires	100
Figure 39 : Voies de signalisation impliquées dans le développement tumoral hépatique par le BBP102	
Figure 40 : Symbole indiquant la présence de phtalates CMR dans les dispositifs médicaux, cas pour le DEHP, le BBP et le DBP	111
Figure 41 : Schéma descriptif de l'approche expérimentale mise en œuvre.....	117
Figure 42 : Représentation du fragment caractéristique des plastifiants appartenant à la famille des esters de l'acide phtalique.....	125
Figure 43 : Gradient de phase mobile optimisé pour l'analyse des plastifiants en HPLC-DAD (représentation pour les variations du pourcentage d'acétonitrile (ACN))	125
Figure 44 : Schéma représentant les procédures d'extraction des plastifiants à partir des gants	127
Figure 45 : Illustration du profil d'exactitude.....	128
Figure 46 : Schéma représentant le plan de validation mis en œuvre	129
Figure 47 : Cellules HMEC-1 observées dans les flasques de culture à différents stades au microscope optique (objectif x10)	133
Figure 48 : Approches méthodologiques pour évaluer <i>in vitro</i> la toxicité endothéliale des plastifiants	134
Figure 49 : Protocole de l'extraction cellulaire (glutathion total intracellulaire et adénosines phosphates intracellulaires) par l'acide perchlorique en plaque 6 puits.....	136
Figure 50 : Principe du dosage de glutathion total intracellulaire par spectrophotométrie.....	137
Figure 51 : Principe du dosage des protéines par la méthode de Lowry	138
Figure 52 : Schéma récapitulatif des effets des plastifiants (DEHP, DINP et MIX) observés sur les cellules endothéliales HMEC-1, à la suite des expositions continues.....	208

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principaux domaines d'application des plastifiants en Europe.....	20
Tableau II : Principales caractéristiques des plastifiants	36
Tableau III : Ordres de grandeur d'exposition aux plastifiants selon les voies.....	40
Tableau IV : Méthodes analytiques utilisées pour les plastifiants.....	80
Tableau V : Estimation des pourcentages d'absorption de plastifiants pour les différentes voies d'exposition	86
Tableau VI : Pourcentages urinaires de la dose administrée par voie orale	87
Tableau VII : Pourcentages urinaires de la dose administrée par voie inhalée	88
Tableau VIII : Pourcentages urinaires de la dose administrée par voie cutanée	89
Tableau IX : Exemples de demi-vies dans le compartiment sanguin à la suite d'une administration par voie intraveineuse	92
Tableau X : Demi-vies tissulaires du DEHP et du MEHP à la suite d'une administration par voie orale	92
Tableau XI : Échantillonnage de gants étudiés.....	121
Tableau XII : Gradient de température optimisé pour l'analyse des plastifiants en GC-MS	123
Tableau XIII : Paramètres de masse optimisés en mode SIM pour l'analyse des plastifiants en GC-MS	124
Tableau XIV : Gammes d'étalonnage et contrôles qualité de la validation en GC-MS.....	129
Tableau XV : Gammes d'étalonnage et contrôles qualité de la validation en HPLC-DAD.....	129

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ACN :	Acétonitrile
ADP :	Adénosine diphosphate
AhR :	Aryl hydrocarbon receptor
AMP :	Adénosine monophosphate
APCI :	Ionisation chimique à pression atmosphérique
ASE :	Extraction accélérée par solvant
ATBC :	Citrate tributylque d'acétyle
ATP :	Adénosine triphosphate
BBP :	Phtalate de benzyle et de butyle
BSA :	Albumine sérique bovine
CAR :	Récepteur constitutif des androstanes
CH₂Cl₂ :	Dichlorométhane
CMR :	Cancérogène, mutagène et/ou toxique pour la reproduction
CO₂ :	Dioxyde de carbone
DAD :	Détecteur à barrette de diodes
DBP :	Phtalate de dibutyle
DCHP :	Phtalate de dicyclohexyle
DEDL :	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière
DEHA :	Di-2-éthylhexyl adipate
DEHP :	Phtalate de bis(2-éthylhexyle)
DEHT :	Téréphtalate de bis(2-éthylhexyle)
DEP :	Phtalate de diéthyle
DEP-d₄ :	DEP deutéré
DIBP :	Phtalate de diisobutyle
DIDP :	Phtalate de diisodécyle
DINA :	Diisononyl adipate
DINCH :	Hexahydrophthalate de diisononyle
DINP :	Phtalate de diisononyle
DLLME :	Micro-extraction dispersive liquide-liquide
DMP :	Phtalate de diméthyle
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DNOP :	Phtalate de di-n-octyle

DphP :	Phtalate de diphényle
DPP :	Phtalate de dipropyle
DTNB :	Acide 5,5'-dithiobis-(2-acide nitrobenzoïque)
ECAR :	Taux d'acidification extracellulaire
ESI :	Ionisation par électronébulisation
FID :	Détecteur à ionisation de flamme
FTIR :	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GC :	Chromatographie en phase gazeuse
GC-MS :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GRED :	Glutathion réductase
GSH :	Glutathion réduit
HDL :	Lipoprotéines de haute densité
HMEC-1 :	Cellules endothéliales microvasculaires issues du derme humain
HPLC :	Chromatographie en phase liquide haute performance
HPLC-DAD :	Chromatographe en phase liquide haute performance couplée au détecteur DAD
HSSE :	Extraction par adsorption en espace de tête
HUVEC :	Cellules endothéliales issues de la veine ombilicale humaine
ICAM-1 :	Intercellular adhesion molecule-1
IUPAC :	Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
LDL :	Lipoprotéines de basse densité
LLE :	Extraction liquide-liquide
MEHP :	Phtalate de mono(2-éthylhexyle)
MEP :	Monoester de diéthyle
MEPS :	Micro-extraction en phase solide
MINCH :	Monoisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate
MS :	Spectrométrie de masse
MS/MS :	Spectrométrie de masse en tandem
MTT :	Methyl thiazolyl tetrazolium
NADPH :	β -Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaOH :	Hydroxyde de sodium
NF-κB :	Nuclear Factor-Kappa B
OCR :	Taux de consommation en oxygène
PBS :	Tampon phosphate salin
PCA :	Acide perchlorique

PPAR :	Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes
PVA :	Polyalcool de vinyle
PVAc :	Polyacétate de vinyle
PVB :	Polybutyral de vinyle
PVC :	Polychlorure de vinyle
QuEChERS :	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
REACH :	Règlement relatif à l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des produits chimiques
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène
SBSE :	Extraction par adsorption sur un barreau d'agitation
SDS :	Sodium dodécylsulfate
SFC :	Chromatographie en fluide supercritique
SFE :	Extraction par fluide supercritique
SFSTP :	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
SIM :	Single ion monitoring
SPE :	Extraction en phase solide
SPME :	Micro-extraction en phase solide
SVF :	Sérum de veau fœtal
TD :	Désorption thermique
TOTM :	Trimellitate de trioctyle
VCAM-1 :	Vascular cell adhesion molecule-1

AVANT-PROPOS

Les plastifiants sont des substances chimiques dont la consommation n'a cessé de croître au cours des dernières décennies. Ils sont principalement utilisés en tant qu'additifs chimiques pour rendre les matériaux souples et élastiques. Présents dans de nombreux produits de consommation, l'exposition humaine aux plastifiants se caractérise par un contexte de multi-exposition. Les voies et les sources d'exposition sont multiples et peuvent se combiner. Cela est préoccupant car ils ne sont pas liés de manière covalente et peuvent donc être relargués. Plusieurs études ont rapporté l'implication des plastifiants dans différentes toxicités d'organes. Certaines substances sont actuellement considérées comme préoccupantes pour la santé car présumées toxiques pour la reproduction et/ou avec une activité de perturbation endocrinienne, ce qui a favorisé leur substitution par des plastifiants alternatifs. Cependant, les données de toxicité restent limitées pour ces plastifiants dits « alternatifs ». Par ailleurs, le nombre de substances réglementées est faible au regard de la diversité de cette famille chimique. Les gants à usage professionnel assurent la protection des mains, ils constituent un équipement indispensable en milieu professionnel. Malgré leur usage répandu dans la sphère professionnelle, les informations disponibles concernant la composition des gants sont limitées, notamment pour les plastifiants.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte, en étudiant les plastifiants dans les gants à usage professionnel. Il s'articule en deux grandes parties :

- une partie analytique, au cours de laquelle des développements analytiques ont été menés pour déterminer la composition en plastifiants dans des gants ; cette étude a été menée en collaboration avec l'unité de recherche GRITA de l'Université de Lille ;
- une partie biologique, visant à évaluer *in vitro* la toxicité endothéliale de plastifiants, en s'intéressant à leurs effets individuels et en mélange.

Ce manuscrit se divise en cinq parties. La première partie (Introduction) correspond à un état de l'art sur les généralités sur les plastifiants (Chapitre 1), le contexte de multi-exposition et les méthodes d'analyse (Chapitre 2) ainsi que les conséquences sanitaires des expositions aux plastifiants (Chapitre 3). La deuxième partie (Matériels et méthodes) décrit les aspects méthodologiques mis en œuvre au cours de ce travail de thèse. La troisième partie (Résultats) présente les résultats obtenus, ils sont présentés sous forme d'articles (Article 1 et Article 2). La quatrième partie (Discussion générale) fait une synthèse des résultats obtenus en les discutant. Pour finir, la cinquième partie (Conclusions et perspectives) présente les principales conclusions issues de ce travail.

CHAPITRE 1 – LES PLASTIFIANTS

1. Généralités

1.1. L'ère du plastique

La production de plastique a atteint des niveaux inégalés. En l'espace de moins d'un siècle, la production mondiale est passée de deux millions de tonnes à 368 millions de tonnes (1,2). Cette progression est fulgurante, elle souligne l'usage polyvalent de la matière plastique et, de surcroît, son omniprésence dans nos espaces de vie.

La notion de matière plastique désigne au sens large les thermoplastiques, les thermodurcissables et les élastomères. Les thermoplastiques sont des matériaux pouvant être déformés de manière réversible sous l'action de la chaleur et dont le durcissement a lieu par refroidissement. Le polychlorure de vinyle (PVC) appartenant à la famille des résines polyvinyliques en est un exemple. Par opposition, les thermodurcissables sont des matériaux qui se rigidifient par chauffage et dont l'état n'est pas réversible ultérieurement sous l'action de la chaleur. À titre d'exemple, les résines époxydes appartiennent aux thermodurcissables. Les élastomères sont quant à eux des matériaux aux propriétés élastiques pouvant être déformés de manière réversible à température ambiante. Les caoutchoucs naturel (latex) et synthétiques (nitrile, néoprène) sont des exemples d'élastomères (3). Il convient de souligner que par la suite, les qualificatifs « matière plastique » et « plastique » seront utilisés de manière égale.

Le plastique présente l'avantage d'allier des propriétés de résistance et de légèreté tout en étant peu onéreux. De plus, le procédé de fabrication est adapté à une production à grande échelle (4). S'inscrivant dans un marché mondialisé, ces éléments expliquent pourquoi et comment le plastique est devenu un matériau de choix. Les usages variés de la matière plastique sont adossés à la production de nombreux produits qui sous-tendent son caractère ubiquiste dans nos espaces de vie, qu'ils soient domestiques ou professionnels, avec des applications diverses (industrielles, médicales, alimentaires, loisirs, etc.). La multitude des produits en plastique manufacturés est à l'origine de l'inévitable exposition humaine au plastique, cela explique pourquoi elle est le sujet d'une attention toute particulière, tant d'un point de vue écologique que sanitaire. Le plastique ne représente pas le seul problème puisque l'exposition au plastique va de pair avec celle des additifs qui lui sont associés (5).

1.2. Les additifs de la matière plastique

Pour aboutir aux produits finis tels que nous les connaissons, la matière plastique à l'état brut fait l'objet de plusieurs étapes de transformation. Les produits manufacturés en plastique correspondent à une association entre une matrice constituée par un polymère avec d'autres substances chimiques, à savoir les additifs.

Au cours du procédé de production des matières plastiques, l'adjonction d'additifs constitue une étape nécessaire. Le recours aux additifs peut avoir lieu à deux niveaux au cours du procédé industriel :

- lors des étapes de synthèse des matériaux plastiques au cours de la réaction de polymérisation (catalyseurs et solvants) ou encore pour faciliter sa mise en œuvre (agents de glissement et lubrifiants) ;
- lors des étapes de transformation des matières plastiques pour modifier les propriétés intrinsèques du matériau pour les utilisations finales auxquelles elles sont destinées, notamment pour modifier les propriétés physiques (agents gonflants, agents de vulcanisation et plastifiants) et pour améliorer leur aspect (colorants).

Par ailleurs, des considérations économiques sur l'utilisation des additifs entrent également en compte puisqu'ils permettent d'abaisser les coûts de production (charges et agents de renfort) et d'augmenter la durée de vie du plastique (stabilisants et antioxydants) (6,7).

La production de la matière plastique est donc un processus au cours duquel de nombreuses substances chimiques auxiliaires peuvent être ajoutées. Les teneurs en additifs sont extrêmement variables puisqu'elles s'échelonnent de quelques dixièmes de pourcent à plus de 50% en masse de la matière plastique (6). D'un point de vue quantitatif, les plastifiants représentent la majeure partie des additifs utilisés par masse de plastique, avec des teneurs pouvant atteindre jusqu'à 70 % (m/m) en masse de matière plastique (8).

1.3. Les plastifiants

Les plastifiants sont des substances chimiques organiques relativement peu volatiles à l'état liquide ou solide, et dont la masse molaire est généralement comprise entre 200 à 600 g/mol. Ils entraînent une modification de l'état de la matière plastique et donc de ses propriétés (5,6,9). Selon la définition établie en 1951 par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), un plastifiant est « *une substance ou un matériau destiné à être incorporé dans un*

autre matériau, généralement un plastique ou un élastomère, afin d'augmenter sa flexibilité, sa mise en œuvre ou son extensibilité » (10).

Trois théories principales ont été postulées pour tenter de rendre compte du procédé de plastification. Elles regroupent la théorie de lubrification, la théorie des gels et la théorie du volume libre. Ces théories fournissent des éléments de compréhension du mécanisme d'action des plastifiants. Ils vont permettre de réduire la rigidité du matériau car ils modifient les forces de liaison (liaisons secondaires de type ionique et hydrogène, liaisons interchaînes) au sein de la structure moléculaire, conduisant à l'affaiblissement de sa force de cohésion. De plus, en s'intercalant entre les chaînes macromoléculaires, les plastifiants augmentent le volume libre ce qui favorise le déplacement des chaînes les unes par rapport aux autres. L'augmentation du volume libre va conférer des propriétés de souplesse en abaissant la température de transition vitreuse. La transition vitreuse correspond à un changement d'état de la matière de l'état solide à l'état visqueux (11). La déformation plastique des matériaux obtenue à l'aide des plastifiants résulte donc des modifications de la structure tridimensionnelle de la matrice dans laquelle ils sont incorporés (Figure 1).

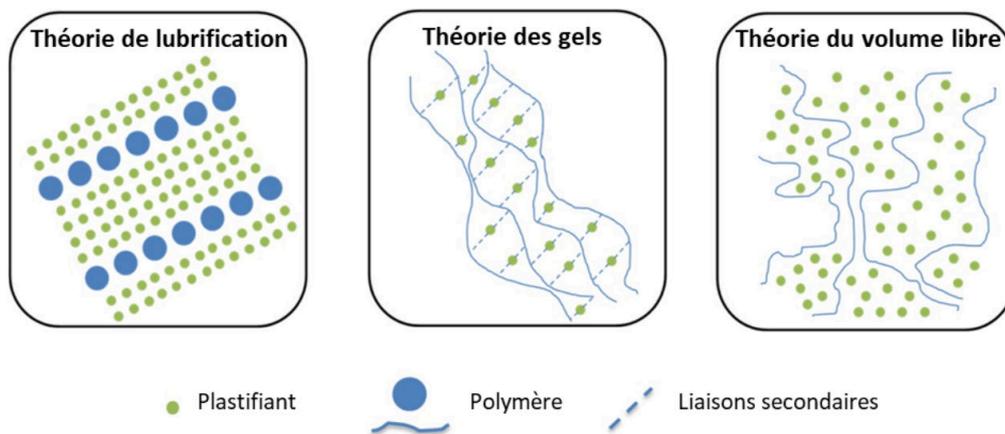


Figure 1 : Schéma représentant les trois théories de la plastification
[In Bocqué *et al.* (2016) (12)]

L'action des plastifiants a été décrite par trois théories principales. La théorie de lubrification décrit le déplacement des chaînes du polymère résultant de l'insertion des plastifiants entre ses chaînes macromoléculaires. La théorie des gels permet d'expliquer la modification de la structure tridimensionnelle du polymère, liée à l'affaiblissement localisé des forces de liaison de la structure polymérique. La théorie du volume libre explique l'abaissement de la température de transition vitreuse à la suite de l'ajout des plastifiants, en raison de l'augmentation du volume libre au sein du polymère.

Les plastifiants sont principalement utilisés pour modifier les propriétés des matériaux plastiques. À titre d'exemple, les plastifiants ont contribué à l'essor du PVC initialement à l'état

rigide, et dont la forme flexible est obtenue par l’ajout de plastifiants. Ils sont aussi employés en tant qu’agents de mise en œuvre au cours des étapes de mélange et d’écoulement durant le procédé industriel ainsi que pour l’obtention de produits finis plats tels que les films (11,13).

1.3.1. Marché des plastifiants

Les plastifiants sont des substances chimiques très largement utilisées. En effet, le marché mondial annuel de production des plastifiants ne cesse de croître, il s’élève à plusieurs millions de tonnes (12,14).

Les données de production reflètent les quantités de plastifiants utilisées pour la fabrication de nombreux produits. La consommation mondiale en plastifiants se chiffrait à 7,5 millions de tonnes en 2020. L’Europe contribuait à hauteur de 18% à cette consommation, se positionnant derrière la Chine et les autres pays d’Asie Pacifique qui se partageaient plus de 50% du marché (14,15). Cette consommation massive en plastifiants concerne une diversité de secteurs d’activité. Les principales applications pour le marché européen ont été répertoriées par catégories de produits pour l’année 2020, selon les estimations réalisées par IHS Markit et European Plasticisers. Ces données témoignent des usages multiples qui sont faits des plastifiants (Tableau I) (14).

Tableau I : Principaux domaines d'application des plastifiants en Europe selon les estimations de IHS Markit et European Plasticisers

Domaines d’application	Part de marché (en %)
Câbles et fils	23%
Revêtements (de sol, mural)	20%
Produits finis plats (films et feuilles)	18%
Autres revêtements	17%
Biens de consommation, applications industrielles	14%
Autres (matériaux caoutchouteux, enrobages, applications médicales et élastomères)	8%

La consommation de plastifiants peut également être analysée selon la nature du polymère considéré car ils sont utilisés pour une variété de matériaux polymériques. En fonction de l’origine des matières premières, les polymères peuvent se répartir en deux catégories. Les polymères de synthèse qui sont issus de la pétrochimie, comme par exemple les polymères vinyliques. Et les polymères d’origine naturelle et autres dérivés qui se composent quant à eux de macromolécules naturelles, tel que le caoutchouc naturel (16). Les plastifiants sont très

fréquemment utilisés avec les polymères vinyliques, dont un en particulier. En effet, le PVC compte à lui seul pour 85% de la consommation totale en plastifiants en Europe (14) (Figure 2).

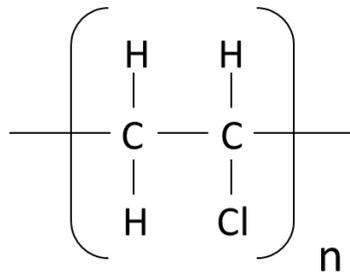


Figure 2 : Structure chimique du PVC

Les autres polymères vinyliques, tels que le polyalcool de vinyle (PVA), le polybutyral de vinyle (PVB) ou encore le polyacétate de vinyle (PVAc), sont également formulés avec des plastifiants. L'utilisation des plastifiants ne se limite pas seulement aux polymères de vinyle. D'autres matériaux polymériques sont aussi concernés, autant des polymères de synthèse (polymères acryliques, polyamides, polyesters, élastomères, etc.) que des polymères d'origine naturelle ou des dérivés de macromolécules naturelles (caoutchouc naturel, polymères cellulosiques, etc.) (11,12,15).

1.3.2. Classifications des plastifiants

De manière analogue à la classification des polymères en fonction de l'origine de leur matière première, les plastifiants peuvent être soit issus de la biomasse tels que la gélatine et les polyhydroxyalcanoates, soit issus de la pétrochimie tels que les polychlorures de vinyle et les polyamides (12). Par ailleurs, il y a deux classifications qui s'appliquent plus communément pour les plastifiants.

Une classification a été établie selon la compatibilité du plastifiant avec le polymère, en faisant la distinction entre les plastifiants primaires et les plastifiants secondaires. Les plastifiants primaires permettent à eux seuls d'atteindre des performances techniques satisfaisantes tout en présentant une bonne compatibilité, contrairement aux seconds. Bien que les plastifiants secondaires permettent d'abaisser le prix de revient car ils sont peu coûteux, ils nécessitent d'être associés aux plastifiants primaires en raison d'une compatibilité moindre avec le polymère ou s'expliquant par des performances réduites (11). Toutefois, il faut considérer que

cette classification n'est pas figée car un même plastifiant peut être alternativement plastifiant primaire ou plastifiant secondaire, selon les applications considérées (9,17).

D'autre part, les plastifiants peuvent également être classés selon le procédé de plastification mis en œuvre. Les plastifiants sont liés de manière covalente au polymère au cours du procédé de plastification interne. Tandis que dans le cadre du procédé de plastification externe, l'association entre les plastifiants et le polymère est régie par des interactions non covalentes. Malgré le caractère moins durable de la plastification externe en raison des interactions faibles, il est intéressant de constater que ce procédé est davantage répandu, et ce en dépit d'un relargage possible des plastifiants (12). En effet, cela laisse une plus grande marge de manœuvre aux industriels au regard de la spécificité visée pour les performances souhaitées (18).

Aussi, par la suite, ce travail se concentrera sur les plastifiants utilisés dans le cadre de la plastification externe, en portant une attention toute particulière aux plastifiants dits primaires.

1.3.3. Considérations pour la plastification externe

Au cours du procédé de plastification externe, la compatibilité apparaît comme un critère déterminant lors du choix du plastifiant. L'homogénéité du mélange formé avec le polymère va en dépendre puisque les plastifiants sont des substances auxiliaires qui sont ajoutées dans la matrice polymérique.

Les fondements de cette compatibilité reposent sur trois facteurs. Il y a tout d'abord le paramètre de solubilité qui caractérise *a priori* le degré d'interaction moléculaire, à savoir ici l'interaction entre le plastifiant et le polymère. La compatibilité étant définie par la différence de solubilité entre les matériaux. Théoriquement, plus la différence de solubilité est faible entre les matériaux, plus ils sont considérés comme étant compatibles. Néanmoins, en pratique cela n'est pas toujours vérifié puisque deux matériaux peuvent ne pas être compatibles alors même que leurs paramètres de solubilité sont proches. Ce facteur de solubilité bien que nécessaire n'est donc pas suffisant pour expliquer la notion de compatibilité. La polarité est un facteur qui doit également être considéré car le degré de compatibilité entre deux matériaux est d'autant plus important lorsqu'ils sont de même polarité. La structure chimique des plastifiants conditionne également cette compatibilité puisque le degré d'interaction avec le polymère est étroitement lié aux groupements fonctionnels dont se composent les plastifiants (présence de chaîne(s) linéaire(s) ou ramifiée(s), structure cyclique ou non et aromaticité) (12).

La compatibilité ne constitue pas l'unique critère dans le choix des plastifiants. D'autres éléments entrent également en compte et sont les suivants (11) :

- l'efficacité qui correspond à la diminution de la rigidité du polymère pour obtenir la souplesse souhaitée dans le produit fini ;
- la stabilité qui est requise pour assurer une certaine durabilité de la capacité plastifiante tout au long du cycle de vie du produit, depuis la fabrication jusqu'à l'utilisation ;
- les données relatives aux effets des plastifiants sur la santé et donc de leur toxicité doivent être considérées, dans la mesure de leur disponibilité, pour en justifier le choix ;
- l'aspect économique constitue un autre critère qui va dépendre de la disponibilité des matières premières et de la technicité des procédés industriels.

L'ensemble de ces éléments concourent *in fine* à obtenir un produit fini plastifié en accord avec les performances techniques voulues pour satisfaire à l'utilisation à laquelle il est destiné.

Compte tenu de ces critères bien définis, il faut souligner que le plastifiant universel satisfaisant à toutes ces conditions n'existe pas. Ceci explique pourquoi plus de 30 000 plastifiants ont été synthétisés jusqu'à nos jours, parmi lesquels seulement une cinquantaine de substances sont effectivement disponibles sur le marché (11,14). Cette variété de plastifiants qui est proposée s'explique par les usages pluriels puisqu'ils concernent un vaste champ d'applications. Toutefois, cette diversité est contrastée vis-à-vis de leur utilisation. Les tendances observées sur le marché des plastifiants montrent une forte disparité et soulignent une utilisation moindre des plastifiants issus de la biomasse. En effet, les plastifiants les plus utilisés sont majoritairement issus de la pétrochimie.

L'organisation professionnelle European Plasticisers a pour mission la diffusion de l'information concernant le marché européen des plastifiants. Elle regroupe les principales firmes productrices de plastifiants en Europe, et elle est rattachée au Conseil Européen de l'Industrie Chimique. Selon les estimations d'une étude récente réalisée conjointement par IHS Markit et European Plasticisers, la famille des esters de l'acide phtalique domine le marché européen, puisque les *ortho*-phtalates et les téréphtalates représentent 69% du marché. Les composés aliphatiques (8%), les cyclohexanoates (8%), les benzoates (3%) et les trimellitates (3%) se partagent quant à eux 22% de parts de marché. La part restante, qui se chiffre à 9%, regroupe tous les autres plastifiants (14).

2. Principaux plastifiants

Au vu de la très grande diversité des plastifiants commercialisés, une description qui se voudrait exhaustive s'annonce complexe. Afin de refléter le marché actuel, il conviendra dans cette partie de s'intéresser aux principaux plastifiants utilisés dans le cadre du procédé de plastification externe, d'après l'analyse de marché réalisée en 2020 par IHS Markit et European Plasticisers.

Bien que très divers en structure, il est possible d'identifier des entités structurales qui sont communes aux plastifiants. Dans le cadre de leur description, les familles de plastifiants vont ainsi être réparties en trois grandes catégories chimiques, à savoir les hydrocarbures aromatiques (phtalates, benzoates et trimellitates), les hydrocarbures aliphatiques cycliques (cyclohexanoates) et les hydrocarbures aliphatiques acycliques (adipates, azélates, sébaçates et citrates) (12). Pour chaque famille, les informations relatives à leurs propriétés physico-chimiques, à leur synthèse et à leurs usages vont être abordées.

2.1. Hydrocarbures aromatiques

Les hydrocarbures aromatiques sont des composés organiques qui se caractérisent par la présence d'au moins un motif aromatique dans leur structure. Les phtalates, les benzoates et les trimellitates appartiennent à cette famille chimique.

2.1.1. Les esters de l'acide phtalique

Les plastifiants appartenant à cette famille sont des esters dérivés de l'acide benzènedicarboxylique, également appelé acide phtalique. Selon l'isomère considéré au cours de l'étape de synthèse, ils peuvent se répartir en deux sous-familles.

2.1.1.1. *Ortho*-phtalates, dits « phtalates »

La structure des *ortho*-phtalates (plus communément nommés phtalates) comporte un cycle benzénique substitué par deux fonctions esters en *ortho* dont chacune est liée à un groupement alkyle de longueur variable (R_1 et R_2). La structure chimique commune aux phtalates est représentée en figure 3. Ces plastifiants sont produits par réaction d'estérification entre l'acide phtalique et un ou plusieurs alcool(s). Ils peuvent aussi être produits à partir de l'anhydride phtalique (5).

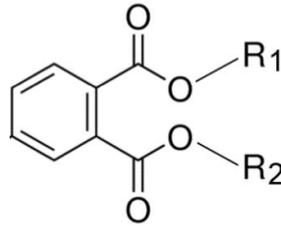


Figure 3 : Structure chimique commune aux phtalates

Parmi les phtalates, différentes catégories se distinguent. « En fonction de la longueur des groupements alkyles qui les composent, les phtalates peuvent être répartis en deux groupes :

- les phtalates de bas poids moléculaire dont les chaînes alkyles comportent un à six atomes de carbone, comme le phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP), ou encore le phtalate de diméthyle (DMP).

- les phtalates de haut poids moléculaire, comme le phtalate de di-n-octyle (DNOP), ont quant à eux sept à treize atomes de carbone sur leurs fonctions esters.

Selon la nature des chaînes alkyles, les phtalates peuvent être symétriques, c'est le cas du phtalate de dibutyle (DBP), non symétriques comme le phtalate de benzyle et de butyle (BBP), ou encore non totalement définis. Ces derniers se composent d'un mélange d'isomères de position, dits « iso-phtalates », à l'instar du phtalate de diisononyle (DINP) correspondant à un mélange d'isomères en C9 sur les chaînes alkyles » (5). Les structures chimiques des plastifiants précédemment évoqués sont présentées en figure 4.

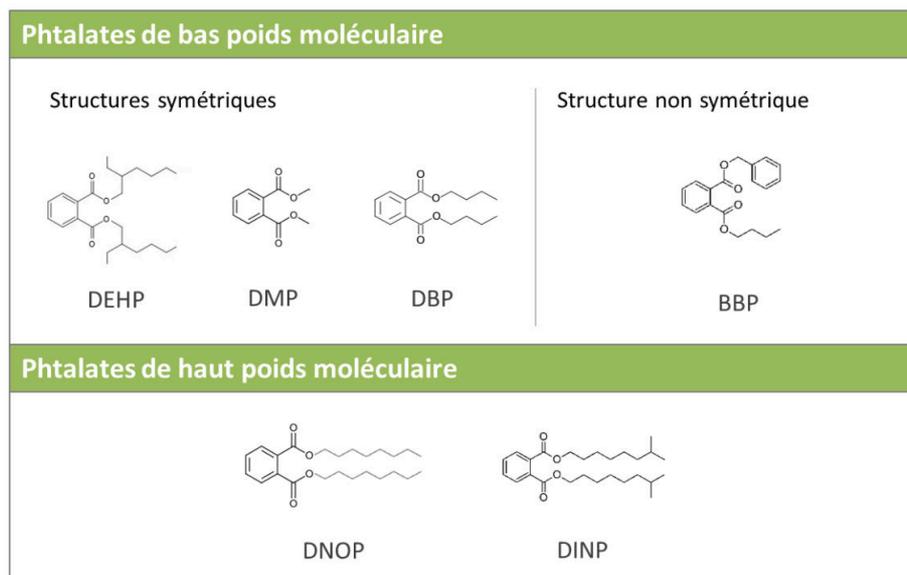
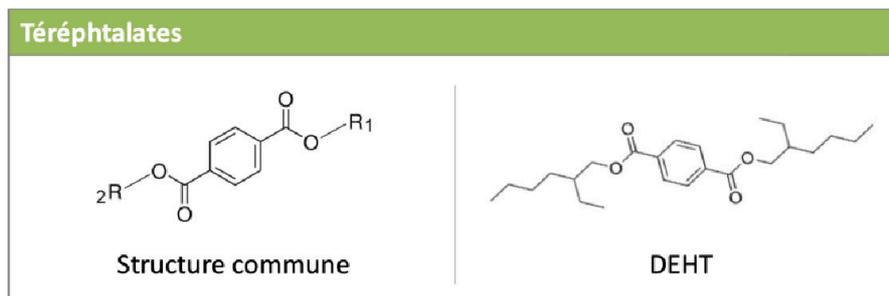


Figure 4 : Structures chimiques des principaux phtalates cités

Les domaines d'application des phtalates sont variés car ils incluent les secteurs agro-alimentaire et cosmétique, l'industrie automobile ainsi que le secteur médical. La part de marché attribuable aux phtalates a été estimée à plus de 50% en 2020 en Europe, ce qui en fait la principale famille de plastifiants utilisés (14). Ils sont très largement utilisés en association avec les polymères polyvinyliques, et tout particulièrement le PVC puisque cela ne représente pas moins de 95% des usages (19). Ils sont également employés avec les polymères celluloseux, les polymères acryliques et les caoutchoucs (12,20).

2.1.1.2. Téréphtalates

Le squelette des téréphtalates se constitue d'un cycle benzénique substitué en position *para* par deux fonctions esters, qui sont fonctionnalisées par des groupements alkyles respectivement R_1 et R_2 . La structure chimique commune des téréphtalates est illustrée en figure 5. Les téréphtalates peuvent être obtenus par la réaction d'estérification faisant intervenir l'acide *parabenzènedicarboxylique* avec un ou plusieurs alcool(s), ou par transestérification d'un ester téréphtalique, généralement le téréphtalate de diméthyle, avec un ou plusieurs alcool(s) (21).



Ils représentent environ 15% de part de marché en Europe. Le téréphtalate de di-2-éthylhexyle (DEHT) est le principal téréphtalate. Il s'agit d'un isomère de position du DEHP, et c'est pourquoi il constitue un plastifiant alternatif au DEHP en raison de sa similitude structurale. L'application des téréphtalates concerne autant les dispositifs médicaux, les jouets, ou encore la formulation de peintures (5). Toutefois, il faut noter que les téréphtalates présentent à long terme une moins bonne compatibilité avec le PVC, comparativement aux phtalates (22).

2.1.2. Benzoates et dérivés

Les plastifiants de la famille des benzoates se composent d'un cycle benzénique fonctionnalisé par une fonction ester, elle-même reliée à un groupement alkyle de longueur variable (Figure 6). La chaîne alkyle peut également relier deux cycles benzéniques, ce sont dans ce cas des dérivés des benzoates qui sont désignés sous le terme de dibenzoates (Figure 7). Les plastifiants de la famille des benzoates sont synthétisés par la réaction d'estérification faisant intervenir l'acide benzoïque et un ou plusieurs alcool(s). Les dibenzoates sont quant à eux synthétisés par une réaction d'estérification mettant en jeu l'acide benzoïque et un diol (23).

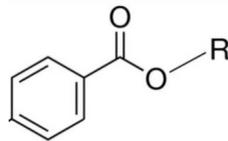


Figure 6 : Structure chimique commune aux benzoates

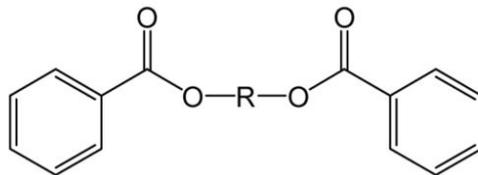


Figure 7 : Structure chimique commune aux dibenzoates

Les plastifiants appartenant à cette famille tels que le benzoate d'isodécyle et le dibenzoate de dipropylène glycol sont principalement utilisés avec les polymères de polyvinyle comme le PVC ainsi qu'avec les polyamides et les polyesters (Figure 8). Leurs champs d'applications recouvrent le secteur automobile, les revêtements (de sols et muraux) ainsi que les adhésifs et les films plastiques (12,23).

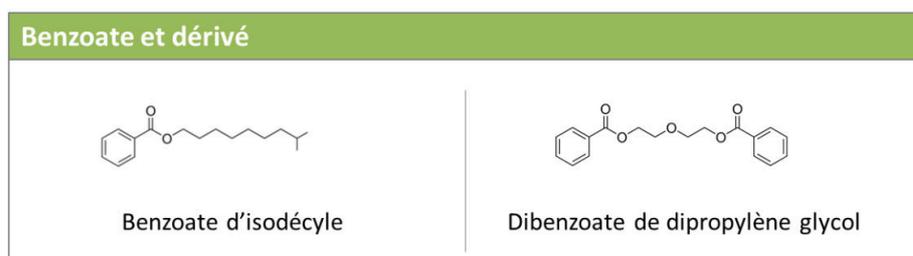


Figure 8 : Structures chimiques des principaux benzoates cités

2.1.3. Trimellitates

Les trimellitates ont une structure qui s'apparente à celles des phtalates. Leur structure est composée d'un noyau benzénique substitué par trois fonctions esters fonctionnalisées par des groupements alkyles, respectivement R_1 , R_2 et R_3 (Figure 9). Ils sont obtenus par réaction d'estérification entre l'anhydride trimellitique et des alcools (5).

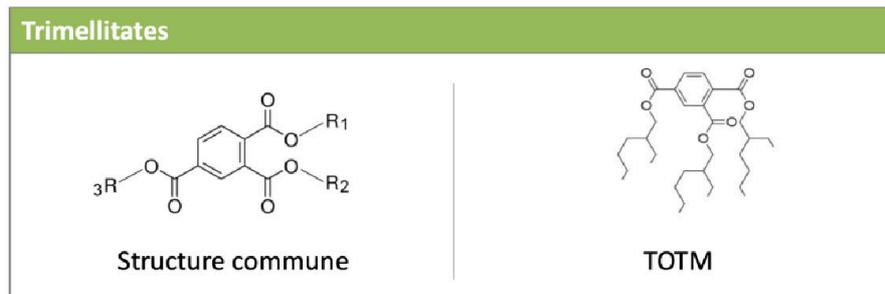


Figure 9 : Structures chimiques des trimellitates (structure commune et TOTM)

Au sein de cette famille, le trimellitate de trioctyle (TOTM) est le plus utilisé, et son application concerne surtout le domaine médical (5). D'autres applications ont également été décrites, elles concernent les câbles et les fils ainsi que les films plastiques (24). Les polymères polyvinyliques sont majoritairement utilisés en association avec les trimellitates (12).

2.2. Hydrocarbures aliphatiques cycliques : cyclohexanoates

Les composés aliphatiques cycliques sont des composés organiques qui se caractérisent par la présence d'un cycle au sein de leur structure. Cette famille chimique est constituée des cyclohexanoates. Les cyclohexanoates (également nommés hexahydrophthalates) sont de conformation non plane contrairement aux phtalates car leur structure comporte un cycle non aromatique. Ils sont obtenus à partir des phtalates par une réaction d'hydrogénation du cycle aromatique (5). La structure chimique commune aux plastifiants appartenant à la famille des cyclohexanoates est représentée en figure 10.

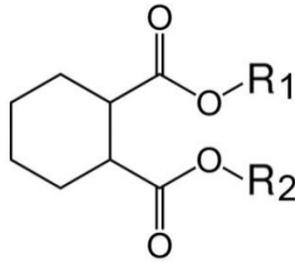


Figure 10 : Structure chimique commune aux cyclohexanoates

L'hexahydrophthalate de diisononyle (DINCH) et l'hexahydrophthalate de diméthyle appartiennent tous deux à cette famille. Le DINCH est le plastifiant le plus utilisé au sein de cette famille (Figure 11). Le champ d'applications des cyclohexanoates inclut la fabrication des dispositifs médicaux, des plastiques destinés aux aliments, des jouets et concerne également le secteur de la construction (5). Les plastifiants de la famille des cyclohexanoates sont majoritairement associés au PVC. Parmi les autres polymères, il y a les polymères acryliques et les polyesters (25,26).

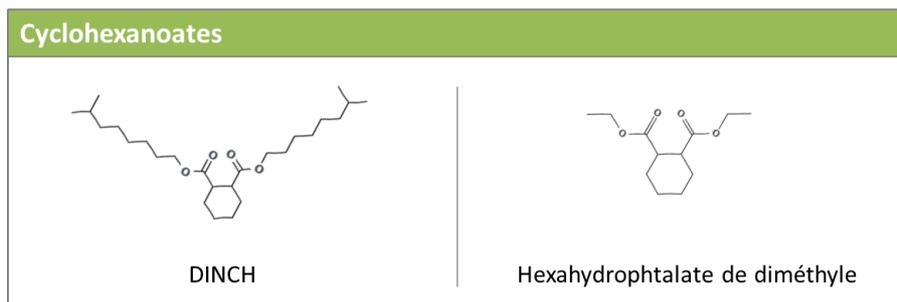


Figure 11 : Structures chimiques des principaux cyclohexanoates cités

2.3. Hydrocarbures aliphatiques acycliques

Les composés aliphatiques acycliques sont des composés organiques dont la structure ne comporte pas de cycle, ni de motif aromatique. Les adipates, les azélates, les sébaçates et les citrates sont inclus dans cette famille.

2.3.1. Les esters de l'acide aliphatique dicarboxylique

Les esters de l'acide aliphatique dicarboxylique partagent une structure chimique commune comportant une chaîne carbonée centrale, substituée à ses extrémités par des fonctions esters fonctionnalisées par des groupements alkyles. La structure commune des plastifiants appartenant à cette famille est présentée en figure 12.

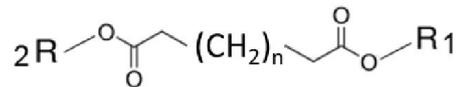


Figure 12 : Structure chimique commune aux esters de l'acide aliphatique dicarboxylique

Ces plastifiants sont produits par réaction d'estérification entre un diacide aliphatique et des alcools (5). En fonction de la longueur de la chaîne centrale, trois sous-familles se distinguent, à savoir les adipates, les azélates et les sébaçates. Ces trois sous-familles vont être décrites dans les sous-paragraphes suivants.

2.3.1.1. Adipates

Le squelette des adipates se compose d'une chaîne principale à six atomes de carbone. Le di-2-ethylhexyl adipate (DEHA) et le diisononyl adipate (DINA) appartiennent tous deux à cette sous-famille (Figure 13).

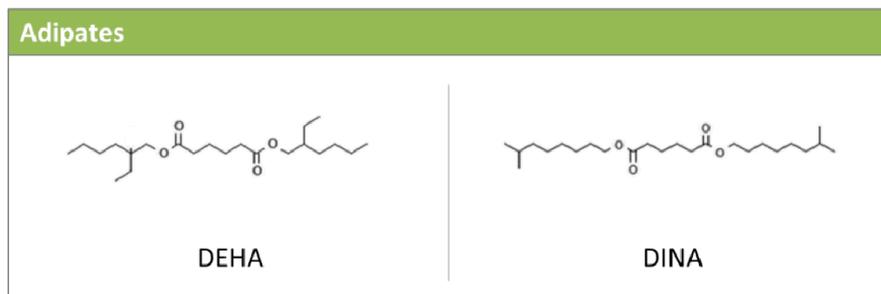


Figure 13 : Structures chimiques des principaux adipates cités

Les adipates font l'objet de diverses applications et sont employés notamment pour les revêtements, les cires, mais aussi pour les films à usage alimentaire. Ils entrent dans le cadre de la formulation de différents matériaux plastiques, en association avec les polymères polyvinyliques, les polymères cellulosiques et les élastomères (12,27).

2.3.1.2. Azélates

La chaîne principale des azélates comporte neuf atomes de carbone. L'azélate de diisodécyle et l'azélate de di-2-éthylhexyle sont deux exemples de plastifiants appartenant à cette sous-famille (Figure 14).

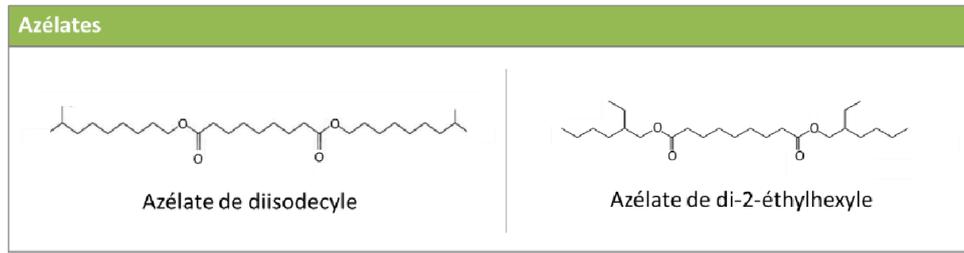


Figure 14 : Structures chimiques des principaux azélates cités

Ils sont notamment utilisés en association avec les polymères vinyliques, avec les composés cellulosiques et avec les élastomères (28,29). Les secteurs d'activité concernés sont divers, ils incluent le secteur automobile, le secteur de la construction ainsi que le secteur agro-alimentaire (28,30).

2.3.1.3. Sébaçates

La chaîne principale des sébaçates est quant à elle composée de dix atomes de carbone. Le sébaçate de dibutyle et le sébaçate de di-2-éthylhexyle en sont deux représentants (Figure 15).

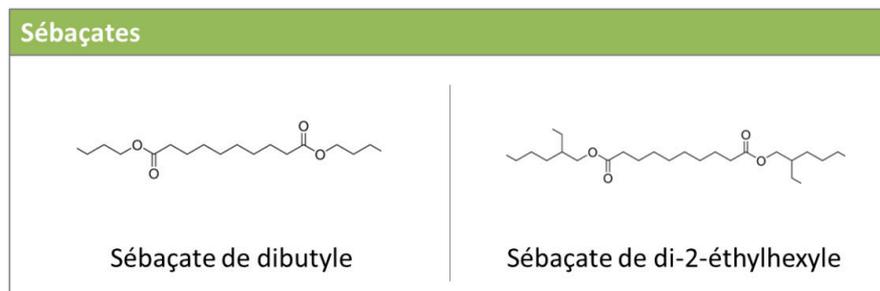


Figure 15 : Structures chimiques des principaux sébaçates cités

Ils peuvent être utilisés dans les plastiques à usage pharmaceutique, médical et alimentaire, mais leurs usages sont moins courants (5). L'usage des sébaçates concerne autant les polymères polyvinyliques, les polymères cellulosiques, les polymères acryliques que le caoutchouc (12,20).

2.3.2. Citrates

La structure des plastifiants de la famille des citrates se compose d'au moins trois fonctions ester (Figure 16). Ils sont principalement obtenus par estérification de l'acide citrique mais ils

peuvent aussi être obtenus par réaction d'acétylation entre le citrate de tri-n-butyle et l'anhydride acétique (5).

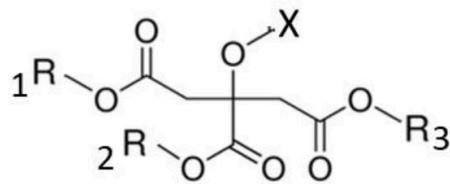


Figure 16 : Structure chimique commune aux citrates
(X : atome d'hydrogène ou dérivé carbonylé)

À titre d'exemple, le citrate de tri-n-butyle et le citrate tributylque d'acétyle (ATBC) appartiennent tous deux à cette famille (Figure 17). Les plastifiants de la famille des citrates sont principalement utilisés pour la production de plastiques pour les dispositifs médicaux et au contact des aliments. D'autre part, l'utilisation des citrates en tant qu'excipient a été rapportée pour certaines formes pharmaceutiques (5). Ils sont mis en œuvre dans les matériaux plastiques à base de polymère polyvinylique, de polymère cellulosique ou encore de caoutchoucs (12).

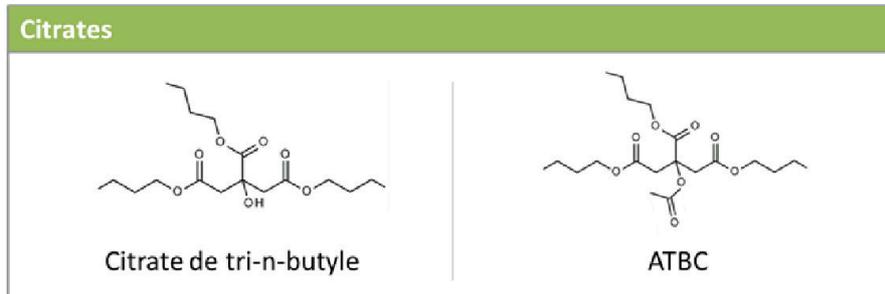


Figure 17 : Structures chimiques des principaux citrates cités

3. Propriétés physico-chimiques des plastifiants

L'efficacité de la plastification est fonction d'une part de la proportion de plastifiants introduits initialement en vue de satisfaire à l'utilisation finale. D'autre part, elle dépend également de paramètres intrinsèques des molécules. Pour les produits plastifiés, les performances acquises sont étroitement liées aux propriétés physico-chimiques des plastifiants, ce qui explique ainsi la diversité de plastifiants commercialisés.

Bien que les plastifiants puissent être répertoriés en différentes catégories selon leur structure chimique, cette diversité chimique n'exclut toutefois pas la présence d'entités structurales communes. Effectivement, les plastifiants partagent des éléments communs dont la présence n'est pas sans effet sur l'interaction avec le polymère. La synthèse des principaux plastifiants est généralement obtenue à la suite d'une réaction d'estérification. Ainsi, ils présentent tous au moins une fonction ester dans leur structure chimique. Ce groupement fonctionnel contribue à la stabilité du mélange entre le polymère et le plastifiant par la mise en jeu d'interactions non covalentes (Figure 18) (12,31).

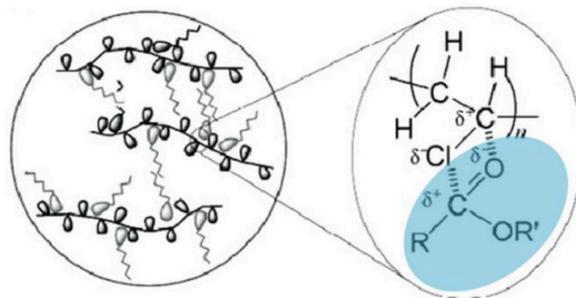


Figure 18 : Illustration des interactions entre le PVC et la fonction ester du plastifiant
[adaptée de Waskitoaji *et al.* (2012) (31)]

De plus, les plastifiants ont en commun la présence de chaîne(s) aliphatique(s) plus ou moins longue(s), dont la nature détermine le degré de flexibilité du polymère plastifié en contribuant au volume libre du polymère. Par ailleurs, la présence d'un noyau aromatique dans la structure du plastifiant participe à ce volume libre et offre une meilleure compatibilité avec le polymère car c'est une structure qui est polarisable. Cela explique pourquoi l'aromaticité est une propriété qui est souvent retrouvée parmi les plastifiants (12).

À côté des considérations structurales qui viennent d'être évoquées, le procédé de plastification est tributaire d'autres propriétés physico-chimiques intrinsèques aux plastifiants, qui interviennent sur trois composantes. Afin de comprendre leurs impacts sur la plastification, ces propriétés vont être énumérées au regard de ces composantes (17,18,28).

- L'efficacité : elle se définit comme étant la capacité d'un plastifiant à réduire la rigidité d'un polymère. Elle correspond aux performances à basse température. L'affaiblissement des forces de cohésion de la matrice polymérique est fonction de la structure chimique des plastifiants. Les structures aromatiques vont augmenter le volume libre au sein de la matrice qui correspond au volume non occupé par les unités constitutives du polymère. Les structures linéaires vont permettre la mobilité à l'échelle moléculaire en s'intercalant entre les chaînes du polymère ce qui affaiblit les interactions interchaînes (Figure 19). La nature des chaînes alkyles entre aussi en compte puisque la capacité plastifiante diminue avec le degré de ramification. Par ailleurs, les molécules fortement polarisées n'offrent pas une bonne capacité plastifiante. La masse molaire des molécules constitue un autre élément déterminant sur cette composante, car ce paramètre sous-tend la diffusion du plastifiant au sein du polymère.

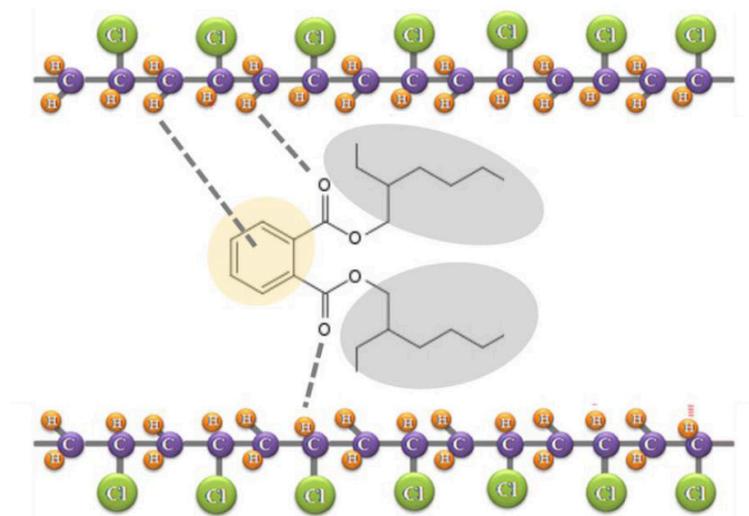


Figure 19 : Schéma représentant l'interaction entre le DEHP et le PVC
[adapté de Chen *et al.* (2018) (32)]

- La compatibilité : elle correspond à l'aptitude d'un plastifiant à se mélanger et à rester dispersé au sein de la matrice polymérique. Elle repose sur le pouvoir de solvation des plastifiants, qui augmente en présence de molécules de faible poids moléculaire. D'autre part, la solvation requiert que les deux composés aient une polarité similaire. Par exemple, les plastifiants présentant une entité chimique aromatique tendent à avoir un pouvoir de solvation plus

important puisque cela va favoriser les interactions électriques avec le polymère (liaisons de van der Waals), comparativement aux plastifiants aliphatiques.

- La durabilité : elle exprime la pérennité des propriétés plastifiantes acquises durant tout le cycle de vie du produit plastifié. La température d'ébullition augmente de manière proportionnelle avec la masse molaire. De fait, les plastifiants à haut poids moléculaire, relativement peu volatils, sont moins sujets aux pertes par rapport aux plastifiants de faible poids moléculaire. C'est le cas par exemple du DMP dont le point d'ébullition est plus faible par rapport au DEHP (33,34). De plus, la nature des chaînes alkyles conditionne également la durabilité puisqu'elle sera d'autant plus importante en présence de chaînes ramifiées comparativement aux chaînes linéaires. D'autre part, la solvataion va également influencer sur cette composante, puisqu'elle est étroitement liée à la compatibilité avec le polymère.

La figure 20 illustre les différents paramètres physico-chimiques qui influencent chacune des composantes de la plastification. Ils ne sont pas nettement dissociables car ils peuvent être communs à plusieurs composantes. C'est le cas, par exemple, de la taille des molécules qui conditionne à la fois l'efficacité et la compatibilité. Le choix du plastifiant se révèle donc complexe en raison de l'interdépendance entre ces composantes.

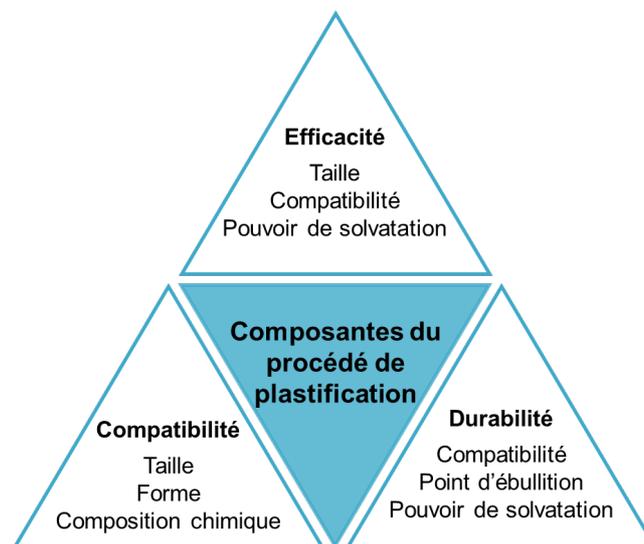


Figure 20 : Influence des propriétés physico-chimiques des plastifiants sur la plastification [adaptée de Immergut *et al.* (1965) (18)]

Le tableau II regroupe les principales caractéristiques des familles de plastifiants qui ont été évoquées dans cette partie.

Tableau II : Principales caractéristiques des plastifiants

Catégorie	Famille chimique	Matière première	Nature du plastifiant	Avantages	Inconvénient(s)	Références
AROMATIQUE	Phtalates	Pétrochimie	Primaire	Grande compatibilité Faible volatilité Peu coûteux Nombreux composés Résistance à l'eau	Restrictions d'usage (cf Chapitre 3, § 4. Aspects réglementaires)	(12)
	Téréphtalates	Pétrochimie	Primaire	Similaires aux phtalates + Faible viscosité Faible degré de migration	Température de mise en œuvre élevée Plus coûteux que les phtalates	(12,22,28)
	Benzoates et dérivés	Pétrochimie	Primaire	Grande compatibilité Température de mise en œuvre faible Faible degré de migration Faible sensibilité à l'humidité Résistance aux ultraviolets et aux taches	Viscosité importante Usages restreints	(23,28)
	Trimellitates	Pétrochimie	Primaire	Grande compatibilité Faible volatilité Stabilité à haute température Faible degré de migration Résistance à l'eau	Coûteux Capacité plastifiante faible	(12,28,35)
CYCLIQUE	Cyclohexanoates	Pétrochimie	Primaire ou secondaire	Faible viscosité Stabilité aux ultraviolets	ND	(17)
ALIPHATIQUE	Adipates	Pétrochimie	Primaire ou secondaire	Capacité plastifiante importante Bonne efficacité à basse température Faible viscosité Durabilité	Faible compatibilité Coûteux Efficacité sur une faible gamme de masses molaires Relativement volatils Tendance à la migration Sensibilité à l'eau	(12,17,28,35)
	Sébaçates	Pétrochimie	Primaire ou secondaire	Capacité plastifiante importante Très bonne efficacité à basse température Faible viscosité	Coûteux Efficacité sur une faible gamme de masses molaires Usages limités aux températures extrêmes	(17,28,35)
	Azélates	Pétrochimie	Primaire ou secondaire	Capacité plastifiante importante Excellente efficacité à basse température Faible viscosité Assez bonne résistance à l'eau	Coûteux Efficacité sur une faible gamme de masses molaires Usages limités aux températures extrêmes	(17,28,35)
	Citrates	Biomasse	Primaire	Bonne capacité plastifiante Grande compatibilité	ND	(28)

ND : non décrit

CHAPITRE 2 – MULTI-EXPOSITION AUX PLASTIFIANTS ET MÉTHODES D'ANALYSE

1. Contexte de multi-exposition

Les plastifiants constituent une part intégrante de notre mode de vie comme en témoigne les usages multiples et variés qui en sont faits. Ils entrent dans la formulation d'un large éventail de produits, ce qui explique leur omniprésence autant dans la sphère domestique que celle professionnelle. Les expositions aux plastifiants peuvent survenir soit de manière directe au cours de l'utilisation des produits, soit de manière indirecte à travers la dissémination des plastifiants dans les milieux environnants. En effet, les plastifiants ne sont pas liés de manière covalente au polymère et ils sont donc sujets à relargage. Dans ce contexte, l'exposition humaine aux plastifiants soulève de nombreuses inquiétudes puisqu'elle peut survenir à travers différentes voies d'exposition (Figure 21).

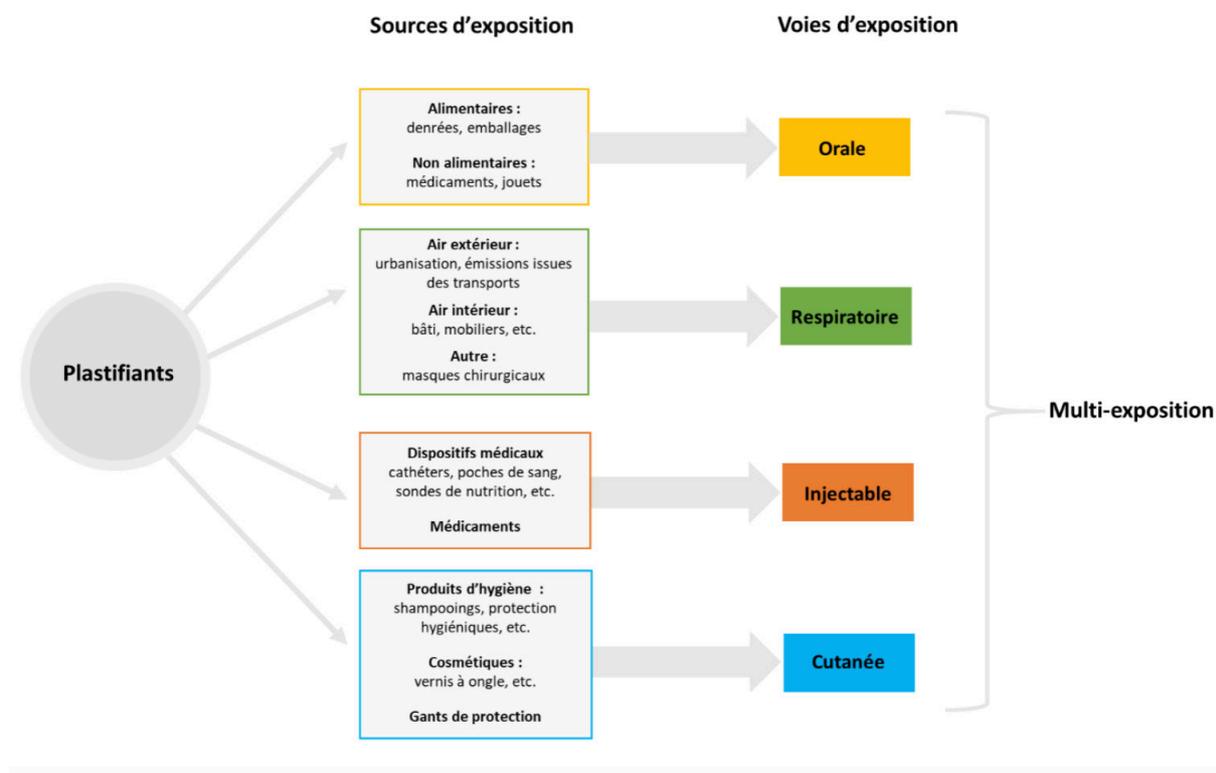


Figure 21 : Contexte de multi-exposition aux plastifiants

Au début du XXI^{ème} siècle, l'exposition aux plastifiants a été estimée pour toutes les voies confondues en moyenne à 2 g/personne/an (17). La progression sans précédent de la production de matières plastiques, qui est observée d'année en année, s'accompagne d'une exposition concomitante aux plastifiants. Ainsi, cela laisse présager une exposition accentuée aux plastifiants, comme en atteste les multiples matrices qui ont été décrites dans la littérature

(alimentation, produits de santé, produits d'hygiène corporelle et cosmétiques, etc.). Le tableau III donne un aperçu du contexte de multi-exposition aux plastifiants. Il regroupe les principales voies d'exposition.

Tableau III : Ordres de grandeur d'exposition aux plastifiants selon les voies

Voie d'exposition	Ordre de grandeur d'exposition ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$)	Références
Orale	10^{-1} à 10^2	Babich <i>et al.</i> , 2020 (36) Kim <i>et al.</i> , 2020 (37)
Respiratoire	10^{-2} à 10^0	Fromme <i>et al.</i> , 2016 (38)
Injectable	10^2 à 10^4	Fernandez-Canal <i>et al.</i> , 2018 (39) Eckert <i>et al.</i> , 2020 (40)
Cutanée	10^{-7} à 10^1	Koniecki <i>et al.</i> , 2011 (41) Ishii <i>et al.</i> , 2015 (42)

Dans cette partie, le contexte de multi-exposition va être abordé en déclinant les différentes sources pour ces quatre voies d'exposition.

1.1. Voie orale

La voie orale a été décrite comme étant une des principales voies d'expositions aux plastifiants (43). Dans ce paragraphe, les différentes sources d'exposition pour cette voie vont être présentées en distinguant les apports alimentaires des apports non alimentaires.

1.1.1. Apports alimentaires

À titre indicatif, la consommation d'aliments en France a été estimée en moyenne à 2,9 kg d'aliments consommés/jour par individu chez la population adulte (44). Cela permet de considérer la part que représenterait l'alimentation en ce qui concerne l'exposition par voie orale aux plastifiants. En effet, l'occurrence des plastifiants a été décrite dans les denrées alimentaires. Au cours de ces dernières années, les études se sont multipliées et ont permis d'analyser un large éventail de produits alimentaires (45–50). Les sources d'origine alimentaire sont généralement étudiées selon deux méthodologies. Dans ce paragraphe, elles vont être présentées successivement, à savoir les études menées sur une sélection de produits commercialisés et les études réalisées dans les conditions de préparation des aliments.

Les composés d'intérêt peuvent être analysés directement sur une sélection de produits commercialisés. Les résultats de ces études ont montré qu'aucune catégorie de produits n'est exempt de plastifiants. Ils ont été dosés autant dans les boissons, les produits laitiers, les poissons et les viandes, les fruits et légumes ou encore les huiles végétales. La fréquence de détection des plastifiants diffère selon les catégories de produits avec une détection plus fréquente pour les aliments suivants : les céréales, les poissons et viandes, les huiles végétales et condiments, et les produits laitiers (45). Le DEHP est le plastifiant qui est le plus fréquemment détecté et dont les concentrations quantifiées sont les plus élevées. Une concentration maximale de 5,9 mg/kg de DEHP a été mesurée dans le poisson commercialisé sur le marché belge (46). La prédominance du DEHP dans les denrées alimentaires ne semble épargner aucune région du monde, puisque cette constatation est observée à l'international (États-Unis, Turquie) (45,47). D'autres plastifiants ont également été retrouvés sur une sélection de produits alimentaires parmi lesquels le DIBP, le BBP et le DBP, tous détectés dans plus de la moitié des échantillons, toutes catégories et toutes études confondues (45,46). Pour ces plastifiants, les apports alimentaires ont été définis comme étant une des principales sources d'exposition (43,45,46).

De plus, les concentrations mesurées sont extrêmement variables au sein d'une même catégorie de produits alimentaires, tous échantillons confondus. En effet, la concentration maximale de DEHP mesurée à 5,9 mg/kg dans les poissons destinés à la consommation humaine ne reflète pas les concentrations quantifiées dans cette catégorie de produits car la concentration médiane est de 0,9 mg/kg (46). Ces variations sont aussi retrouvées entre les différentes catégories de produits alimentaires pour un même composé. Par exemple, les concentrations médianes mesurées pour le DEHP sont comprises entre 0,0001 mg/kg (boissons) et 0,1 mg/kg (matières grasses végétales et animales) (46). Cette variabilité entre les catégories alimentaires a aussi été rapportée dans les travaux de Schechter *et al.* (2013) (45).

Les plastifiants retrouvés dans les aliments soulèvent la question des potentielles sources de contamination. La contamination peut être médiée par les emballages alimentaires en matériaux plastiques du fait de l'interaction contenant-contenu. Ainsi, les plastifiants qui sont partie intégrante du plastique peuvent être relargués puisqu'ils ne sont pas liés de manière covalente aux emballages alimentaires. Toutefois, l'interaction contenant-contenu ne se limite pas seulement aux emballages en plastique puisque d'autres catégories de matériaux sont concernées. Dans la littérature, l'analyse des plastifiants dans les denrées alimentaires intègre aussi la diversité des emballages alimentaires disponibles sur le marché. Les résultats de ces études montrent que les plastifiants sont également dosés dans les aliments contenus dans des

conserves métalliques, des contenants en verre ainsi que les produits emballés avec du papier ou du carton au sein desquels les plastifiants peuvent être utilisés pour la formulation des encres par exemple (45–48). À titre d’exemple, sept plastifiants ont été retrouvés dans un échantillon de sardines commercialisé dans des conserves métalliques avec des concentrations variant de 0,0003 à 0,06 mg/kg (DMP, phtalate de diéthyle (DEP), phtalate de diisobutyle (DIBP), DBP, phtalate de di-*n*-hexyl (DnHP), BBP et DEHP) (45). La contamination des aliments par les films plastiques qui tapissent l’intérieur des conserves est connue. La prise de conscience a notamment émergé pour un autre additif utilisé dans le revêtement des boîtes de conserve, il s’agit du bisphénol A. Il a été montré que la consommation d’aliments conditionnés dans des conserves constitue une source d’ingestion de bisphénol A par migration dans les aliments (51). Par analogie, cette source d’ingestion est également valable pour les plastifiants. La contamination par les phtalates lié aux emballages alimentaires semble corrélée à la catégorie des aliments. Les exemples précédemment cités soulignent une contamination plus importante pour les aliments gras (huiles végétales et poissons) (45,48). En outre, le transfert peut être favorisé par d’autres paramètres, comme par exemple la température de contact ainsi que la durée de contact (45,49,52). Par ailleurs, les huiles végétales conditionnées dans des flacons en verre présentent aussi des teneurs particulièrement élevées en phtalates (DEHP, DBP, DINP et phtalate de diisodécyle (DIDP)), tous échantillons confondus (47,48). Sur cet échantillonnage, la concentration maximale a été quantifiée pour le DEHP (92,1 mg/kg) (47). Cependant, le lien de cette contamination par les phtalates dans les huiles commercialisées dans les flacons en verre n’est pas clair. La contamination serait plutôt liée à la production car la production de l’huile est effectuée avec des équipements en plastique (47,48).

En effet, l’occurrence de plastifiants dans les aliments dépourvus d’emballage dévoile une contamination qui n’est pas uniquement conditionnée par leur contact avec les emballages alimentaires (50). La contamination peut également survenir en amont du produit fini, au cours des procédés de préparation (industriels et extemporanément tels que consommés). Les procédés industriels peuvent constituer une source de contamination par le biais des équipements utilisés qui comportent des éléments en plastique. Cela a été mis en exergue dans l’étude menée par Petersen and Jensen (2016) pour les tuyaux et tapis roulants dans les industries agro-alimentaires (52). La contamination peut également survenir durant la préparation des aliments. Dans ce cadre, il convient d’analyser les portions alimentaires dans les conditions de préparation des aliments tels que consommés (étapes de cuisson et de chauffage). Une étude japonaise a incriminé le rôle des gants en PVC au cours de la préparation

des repas en milieu hospitalier, cette source non alimentaire conduit à une contamination des aliments par les phtalates, les adipates et les citrates (53).

Les activités agricoles constituent elles aussi une source d'émission de plastifiants et donc de contamination des récoltes car ils ont aussi été retrouvés dans les milieux naturels, notamment dans les milieux aquatiques et dans les sols (49).

1.1.2. Apports non alimentaires

L'exposition par voie orale aux plastifiants peut également survenir par des sources non alimentaires. Pour preuve, le secteur pharmaceutique fait usage des polymères pour l'obtention de formes galéniques spécifiques (films orodispersibles et comprimés enrobés). Parmi les plastifiants qui sont utilisés en tant qu'excipients, il y a les citrates, les phtalates et les sébaçates. Ils vont être mis en œuvre pour des applications sous forme de films. C'est le cas par exemple des formes mucoadhésives à action locale, qui vont permettre d'augmenter la biodisponibilité en évitant l'effet de premier passage hépatique (54). Les plastifiants sont généralement utilisés jusqu'à une teneur massique de 20% dans ce cadre (55). Leur utilisation concerne la plastification du polymère en le rendant plus modelable, mais ils participent également à la cinétique de libération du principe actif. Pour les comprimés enrobés, la présence de plastifiants dans l'enrobage va permettre de moduler la libération du principe actif. Par exemple, la libération est retardée en présence de plastifiants hydrophobes, comme le sébaçate de dibutyle et DBP (56).

L'exposition par voie orale aux plastifiants ne se limite pas seulement aux produits ingérés ou administrés par voie orale. Cette exposition peut également survenir après migration des plastifiants dans la salive. Les articles destinés aux enfants ont particulièrement été étudiés car chez cette sous-population le portage à la bouche des objets est fréquent. La composition de ces articles se caractérise par une forte hétérogénéité en plastifiants, avec la présence d'une grande diversité de catégories chimiques (phtalates, téréphtalates, adipates, cyclohexanoates, etc.) (36,37,57,58). Plus récemment, une tendance en faveur de l'usage de plastifiants alternatifs aux phtalates a été constatée, avec un recours plus fréquent du DINCH, du DEHT et de l'ATBC dans les articles destinés aux sujets jeunes (57). Compte tenu de la mise en bouche de ces articles, une exposition par transfert des plastifiants dans la salive est envisageable. Parmi les sujets jeunes, ce mode d'exposition concerne majoritairement les enfants de moins de trois ans, avec une exposition estimée de l'ordre de 10^{-2} mg/kg (37). Les études de migration des plastifiants dans la salive sont actuellement réalisées *in vitro* par simulation dans la salive

artificielle (méthode standardisée par le centre de recherche commun de la Commission Européenne) (36).

Par ailleurs, les enfants en bas âge passent également la majorité de leur temps proche du sol, cela est particulièrement observé avant l'apprentissage de la marche (cf Chapitre 2, § 1.2.2. Air intérieur). Il découle de ce comportement une ingestion plus propice de poussières chez les sujets jeunes. Or il a été montré que les poussières peuvent constituer une source d'exposition aux plastifiants, à la fois par ingestion et par inhalation (43). En effet, les plastifiants peuvent s'adsorber sur les particules présentes dans l'atmosphère.

1.2. Voie respiratoire

La voie respiratoire constitue la deuxième voie d'exposition aux plastifiants, après la voie orale. Les plastifiants sont des composés organiques semi-volatils. Ils peuvent être libérés dans l'atmosphère. Ainsi, l'exposition humaine par voie respiratoire survient dans de nombreux lieux de vie, autant extérieurs qu'intérieurs.

1.2.1. Air extérieur

Un grand nombre de polluants ont été identifiés dans l'atmosphère, les plastifiants n'y dérogent pas (59,60). Ce sont des constituants de l'atmosphère qui ont été retrouvés dans les deux phases qui la composent. La phase gazeuse, plus communément appelée air, est formée d'azote et d'oxygène pour majorité et en proportion moindre d'autres gaz. La phase particulaire correspond aux particules en suspension dans l'air. Les phtalates les plus volatils (DMP, DEP, DBP) se répartissent majoritairement dans l'air, comme en témoigne le ratio phase gazeuse/phase particulaire qui est supérieur à 1 (61). Les phtalates moins volatils se retrouvent adsorbés sur les particules en suspension dans l'air, comme sur les poussières par exemple (61). La volatilité des plastifiants influence donc leur répartition entre ces deux phases. Des paramètres extérieurs peuvent également influencer le devenir des plastifiants dans cette matrice. En effet, lorsque les températures augmentent, ils auraient tendance à se concentrer dans l'air. Les résultats obtenus au cours de l'étude menée par Tiel *et al.* (2016), montrent un doublement de la concentration totale en phtalates avec une élévation de la température de 1,7°C (59,60). Toutefois, dans l'atmosphère, les plastifiants ne sont pas des substances persistantes, cela est lié à leur dégradation par les rayonnements solaires (avec une demi-vie comprise entre 5 heures et 18 jours) (59). La présence des plastifiants dans l'air extérieur est majoritairement d'origine anthropique, car fortement associée à nos modes de vie. Elle

concerne en premier lieu le milieu urbain, où les concentrations mesurées en phtalates ont été reportées jusqu'à $0,17 \mu\text{g}/\text{m}^3$ à Paris (60). Les niveaux mesurés de pollution par les plastifiants sont à géométrie variable car de plus faibles concentrations en phtalates ont été mesurées ($0,03 \mu\text{g}/\text{m}^3$) en périphérie de Paris, sur le site de la forêt de Fontainebleau, au cours de la même période (60). Les sites urbains sont plus touchés car l'urbanisation est plus dense, et ce facteur avec les émissions issues des transports constituent les principales sources d'émission dans l'air extérieur. Par ailleurs, il est probable que les conditions météorologiques puissent jouer un rôle sur la dynamique d'échange entre ces différentes zones géographiques.

Cependant, il faut noter que la description des plastifiants concerne surtout les composés appartenant à la famille des phtalates. Et l'exposition survenant à travers l'air extérieur reste difficile à évaluer puisque les études menées restent assez limitées, comparativement à l'air intérieur (60).

1.2.2. Air intérieur

La pollution par les plastifiants a été présentée comme étant plus importante en atmosphère confinée (60). En effet, les niveaux mesurés en phtalates dans l'air intérieur sont plus élevés par rapport à l'air extérieur, jusqu'à 237 fois plus élevés pour les lieux de résidence en Chine par exemple (61). Le temps passé en milieu clos a été estimé à plus de 80%, ce qui amène à s'interroger quant à la qualité de l'air intérieur (62). En plus de la contribution de l'air extérieur, la pollution de l'air intérieur survient par de nombreuses autres sources. La qualité de l'air intérieur est médiée par le bâti et par l'aménagement des espaces intérieurs ainsi que par le mode de vie, avec l'aération ou encore le calfeutrage.

Maintes études se sont intéressées à analyser l'air intérieur de différents lieux de vie (38,61,63–65). Elles fournissent des données qualitatives et quantitatives sur l'air intérieur autant en milieu professionnel, en milieu scolaire qu'en ce qui concerne les logements. La nature des matériaux de construction et du mobilier utilisés ne seraient pas sans effet, comme cela a été constaté avec la présence de revêtement de sol en PVC (65).

Les résultats issus de l'analyse de poussières intérieures récoltées dans les habitations indiquent qu'elles constituent effectivement une source d'exposition par inhalation aux plastifiants, phtalates (DMP, DEP, DIBP, DBP, BBP, DEHP, DNOP) et non phtalates (DEHA, ATBC) (64). Dans cette étude, une concentration maximale en ATBC a été mesurée dans un logement à hauteur de $2180 \text{ mg}/\text{kg}$. En milieu hospitalier, les plastifiants de la famille des phtalates (DIBP, DBP, DEHP et DINP) et les plastifiants non phtalates (DINCH, DEHT et DEHA) ont aussi été

caractérisés (38,63). Dans ces études, les auteurs ont distingué les concentrations dans l'air et sur les particules en suspension. Dans l'air, une prédominance du DIBP et du DBP a été rapportée avec des concentrations respectives de 468 ng/m³ et de 227 ng/m³. Dans les poussières, le DEHP et le DINCH sont majoritairement retrouvés avec respectivement 888 mg/kg et 302 mg/kg. Il faut noter que l'exposition est fonction des lieux fréquentés. Par exemple, à l'hôpital, les professionnels du corps médical sont davantage exposés aux plastifiants comparativement à d'autres professions comme les enseignants, avec respectivement une exposition journalière par voie respiratoire estimée à 3,0 µg/kg et à 1,5 µg/kg pour l'ensemble des plastifiants étudiés (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP et DNOP) (61). Le temps passé à l'hôpital et le nombre important de dispositifs médicaux (systèmes de transfusion par exemple) et autres matériels en plastique éventuellement sous emballage plastique dans ce lieu expliqueraient une imprégnation plus importante pour cette catégorie professionnelle (64). De plus, le port de masques chirurgicaux constitue une pratique professionnelle courante. Récemment, l'analyse de la composition de masques chirurgicaux a montré qu'ils sont effectivement une source d'exposition par inhalation aux plastifiants (66). De plus, l'entretien très fréquent des établissements de santé pourrait constituer une source car les produits de nettoyage contiennent des plastifiants comme cela a été souligné par l'étude de Viñas *et al.* (2015) (67). Des différences d'exposition ont aussi été observées en dehors du cadre hospitalier. Par exemple, le fait de se rendre dans les salons de coiffure majore l'exposition aux plastifiants puisqu'elle a été estimée comme étant trois fois plus importante (0,3 µg/kg par jour) par rapport à l'exposition dans les logements (64). Dans ce cas, cela pourrait s'expliquer par le fait que ce sont des lieux qui concentrent davantage de produits de soins, dans la composition desquels sont présents les plastifiants.

Il est intéressant de noter qu'en raison de l'évolution de la réglementation (cf Chapitre 3, § 4. Aspects réglementaires), un recul de l'utilisation des phtalates à chaînes courtes a été observé au cours du temps au profit des plastifiants alternatifs non phtalates comme le DINCH et l'ATBC ainsi que des phtalates à chaînes longues comme le DINP (38,63,64). Cependant, les phtalates réglementés continuent d'être mesurés dans l'air intérieur, puisqu'une concentration de 1230 mg/kg a été quantifiée pour le BBP dans un échantillon dans l'étude de Subedi *et al.* (2017) (64).

1.3. Exposition par voie injectable

À côté de ces deux voies majoritaires d'exposition aux plastifiants, une exposition par voie injectable avec l'utilisation des dispositifs médicaux n'est pas à écarter. Bien que de contribution moindre chez la population générale, elle n'est toutefois pas à négliger chez les patients hospitalisés. Cette exposition se caractérise notamment par la nature de l'intervention (acte invasif ou non ; degré invasif de l'acte), la durée de l'hospitalisation ainsi que par la nature et la composition des produits utilisés. Jusqu'à présent, le PVC a largement été utilisé comme plastique de qualité médicale à destination de la fabrication des dispositifs médicaux, pour lesquels des teneurs massiques en plastifiants jusqu'à 40% ont été rapportées dans la littérature (39,68,69). Les principaux plastifiants qui ont été décrits regroupent les phtalates, les adipates, les cyclohexanoates, les citrates et les trimellitates (70).

En milieu hospitalier, les dispositifs médicaux sont utilisés dans le cadre de procédures de soins, mais également au cours d'interventions à risque tels que dans les services de chirurgie cardiaque comme chez les patients placés sous oxygénation par membrane extracorporelle (70). Pour ces patients, l'exposition est continue, peut durer plusieurs dizaines de jours et le circuit est placé à 37°C, ce qui constitue autant de facteurs pouvant majorer l'exposition aux plastifiants. Cela est préoccupant car en conditions expérimentales, par simulation avec l'éthanol, la migration de DEHP a été observée durant six jours consécutifs de l'ordre du mg/l avec une exposition journalière estimée à 0,68 mg/kg (39). D'une manière générale, les études menées sur le sujet ont porté une attention particulière aux services hospitaliers suivants : les services de néonatalogie, de soins intensifs et de gynécologie-obstétrique (39,68–71). Les patients admis dans ces services sont très exposés en raison des dispositifs médicaux invasifs utilisés dans le cadre des traitements et des soins. Dans la littérature, six plastifiants principaux ont été identifiés dans ce type de dispositifs médicaux (cathéters, sondes de nutrition, poches de sang, circuits de dialyse, etc.), qu'ils soient ou non en contact du sang, à savoir le DEHP, le DINP, le DEHA, le DINCH, le TOTM et l'ATBC (39,68–73). Or les plastifiants peuvent migrer dans les conditions d'utilisation de ces dispositifs. Ainsi cela soulève la question de l'exposition aux plastifiants survenant dans le cadre de séjours hospitaliers.

La voie parentérale fait l'objet d'un fort intérêt en raison du contact direct avec la circulation sanguine. Inscrit à la Pharmacopée Européenne pour le PVC à usage médical, le DEHP a été préconisé pour les dispositifs médicaux en contact avec les produits sanguins labiles car son relargage permet de réduire le phénomène d'hémolyse et donc d'améliorer la conservation des poches de sang (74). Cependant, le DEHP présente une capacité de relargage importante, exposant à des doses pouvant atteindre jusqu'à 14 mg/kg par jour pendant la circulation extra-

corporelle (39). Dans la Pharmacopée Européenne, le chapitre portant sur les matériaux à base de PVC plastifié a d'ailleurs été révisé en 2017, ayant conduit à l'ajout de quatre plastifiants alternatifs au DEHP, à savoir le DEHT, le DINCH, le TOTM et le citrate de butyryle tri-n-hexyle, car étant moins susceptibles de migrer (70). D'autres plastifiants sont aussi utilisés dans les dispositifs médicaux destinés à la voie parentérale, tels que le DEHA, l'ATBC et le DINP, pour lesquels les concentrations quantifiées sont variables (39,68,69,71,75). Les plastifiants sont également utilisés dans les dispositifs destinés à la nutrition parentérale et entérale ou encore pour l'assistance respiratoire (ATBC, DEHA, DEHT, DINCH, DINP et TOTM) (68,70,71). Le choix des plastifiants alternatifs peut être motivé par un relargage moindre, réduisant ainsi le risque d'exposition. Par exemple, l'exposition liée à la migration du TOTM a été évaluée à 0,03 mg/kg par jour comparativement à celle du DEHP estimée à 0,23 mg/kg par jour (39). Pour le DINCH, une évaluation récente a montré une migration comparable à celle du DEHP, alors que celle-ci avait été considérée comme faible auparavant (71,76). Ces résultats contradictoires révèlent le manque de recul concernant l'utilisation des plastifiants alternatifs au DEHP. Aussi, la capacité de migration doit être évaluée au regard de la nature des substances contenu dans les dispositifs médicaux, puisqu'en présence de substances lipophiles comme dans le sang, la capacité de migration pourrait être plus importante (39).

L'ensemble de ces études montre que l'exposition aux plastifiants par voie injectable est liée aux dispositifs médicaux utilisés dans le cadre des procédures médicales. Le risque de contamination dans le cadre de ces procédures pourrait aussi être lié aux conditions de stockage des solutions administrées par voie injectable. Cette source de contamination a été rapportée pour une autre voie d'exposition, il s'agit de la voie ophtalmique (77). Dans le cadre de cette étude, la présence de DEP a été mise en évidence dans une solution ophtalmique. Le ruban adhésif au contact du flacon en plastique a été identifié comme étant à l'origine de cette contamination ; dans ce cas, la capacité de migration du DEP est liée à sa nature semi-volatile. Au regard de ce résultat, une contamination liée aux conditions de stockage des solutions administrées par voie injectable ne serait donc pas à exclure.

1.4. Voie cutanée

Bien que l'exposition humaine aux plastifiants par voie cutanée soit connue, elle reste néanmoins relativement peu décrite. Pourtant, la peau est en contact direct et quotidien avec des produits formulés avec des plastifiants.

1.4.1. Produits cosmétiques et d'hygiène corporelle

Les plastifiants entrent dans la composition des produits cosmétiques et d'hygiène corporelle, pour lesquels ils peuvent être utilisés comme agent humectant, agent émollient, agent de fixation de couleur, agent parfumant ou encore comme solvant (41,78,79).

Dans les études analysant les plastifiants dans les produits cosmétiques et d'hygiène corporelle destinés à la population adulte, trois plastifiants sont fréquemment détectés et quantifiés, à savoir le DEP, le DBP et le DEHP (41,67,79). Les concentrations en plastifiants sont extrêmement variables, avec des concentrations maximales qui ont été rapportées de l'ordre du mg/g de produit. Les produits à formule sans rinçage, comme les parfums, les vernis à ongles et les déodorants, concentrent des niveaux élevés en plastifiants. Ils détiennent les concentrations les plus importantes, avec jusqu'à 27 400 mg/kg de DBP quantifié dans un échantillon de parfum, et atteignant 25 542 mg/kg de DEP dans une référence de vernis à ongles (41,79). Les ongles constituent effectivement une source d'exposition par voie cutanée car ce sont des annexes cutanées en continuité avec l'épiderme des mains et des pieds. Dans les produits à formule avec rinçage, le DEP est le plastifiant qui est majoritairement quantifié, avec une concentration maximale de 3 530 mg/kg mise en évidence dans une référence de shampooing (79). Par comparaison, la fréquence de détection élevée du DEHP est quant à elle associée à des concentrations relativement moins élevées. Selon les études, les concentrations maximales de DEHP varient de 3 à 1 045 mg/kg, et elles ont toutes été déterminées dans les produits à formule sans rinçage (41,67,79). Des spécificités de marché ont été observées, par exemple pour le marché européen, les principaux plastifiants ont été quantifiés à des niveaux de plusieurs dizaines de mg/kg (67). Tandis que pour le marché nord-américain, les concentrations maximales mesurées peuvent atteindre plusieurs dizaines de mg/g (79). Des liens d'association ont été observés entre l'utilisation de certains produits et l'exposition aux plastifiants comme le montrent les études de biosurveillance ayant mesuré les concentrations urinaires de leurs métabolites. Par exemple, l'exposition au DEP est notamment corrélée avec l'usage de parfums, de lotions, de déodorants et de crèmes, et elle augmente d'autant plus avec le nombre de produits utilisés (78). Comme le recours aux produits d'hygiène corporelle concerne tous les âges de la vie, les produits destinés aux nourrissons et aux jeunes enfants ont aussi été étudiés. Toutefois, l'exposition par voie cutanée serait négligeable chez les enfants en bas âge par rapport aux adultes, et plus spécifiquement par rapport à la population féminine pour qui la consommation s'avère plus importante (79). Par ailleurs, les enfants en bas âge sont également exposés par le biais de l'utilisation de couches. Une étude japonaise a mis en évidence la présence de DEHP et de DBP, de l'ordre de

10^{-1} mg/kg. Bien que le contact avec la peau se caractérise comme étant à la fois direct, prolongé et répété, la dose d'exposition journalière avec le port de couches a été considérée comme négligeable dans le cadre de cette étude (comprise entre 10^{-10} et 10^{-6} mg/kg/j) (42). De même, les plastifiants ont aussi été détectés dans la majorité, voire l'ensemble, des produits d'hygiène féminine étudiés (80,81). Dans ces études, les concentrations totales en phtalates mesurées sont de l'ordre du mg/kg dans les serviettes hygiéniques, pour l'ensemble de l'échantillonnage. Dans l'étude menée par Tang *et al.* (2019), le DMP, le DEP, le DIBP, le DBP et le DEHP font partie des plastifiants systématiquement retrouvés, tous échantillons confondus (80). L'exposition par contact cutané avec ces produits d'hygiène a été estimée comme étant modérée (10^{-5} mg/kg/j) (80). Le procédé de production et le conditionnement final en plastique constitueraient des sources de contamination pour ces produits (80,81).

1.4.2. Gants de protection

En milieu professionnel, le port de gants constitue une pratique professionnelle quotidienne et qui a bien souvent lieu de manière répétée. Cela soulève la question de l'exposition aux plastifiants liée au port de gants car ils ne sont pas liés de manière covalente. Les plastifiants sont utilisés dans la fabrication des gants pour améliorer l'élasticité de la matière plastique. Malgré l'absence de composition sur l'emballage des boîtes de gants, il n'en demeure pas moins que la présence des plastifiants a été appuyée par les résultats de différentes études. Bien que cela ne constituait pas leur objectif principal, ces études ont caractérisé, dans les gants (vinyle, nitrile et néoprène), la présence de plastifiants appartenant à la famille des phtalates (BBP, DBP, DEHP, DINP et DIDP) et d'un plastifiant de la famille des adipates (DEHA) (52,82–84). Les teneurs quantifiées dans les gants (vinyle, nitrile et néoprène) s'échelonnent de quelques pourcents jusqu'à 43% (m/m). Les teneurs les plus élevées en plastifiants ont été caractérisées dans les gants utilisés dans le secteur agro-alimentaire. De plus, les conclusions issues de ces études s'accordent à dire que les plastifiants entrant dans la composition des gants sont susceptibles d'être relargués lorsque ceux-ci sont portés. À titre d'exemple, il a été montré que la manipulation des solvants organiques représente un facteur de risque majorant l'exposition au DEHP. Cela s'expliquerait par un affaiblissement de l'interaction entre le polymère et le DEHP lors de la diffusion des solvants à travers le gant, expliquant ainsi le relargage observé. Le résultat de cette étude amène à s'interroger au regard des autres plastifiants présents dans les gants. En effet, le DEHP a été le seul plastifiant recherché (83). Dans le cadre de cette même étude, la dose d'exposition journalière au DEHP liée au port de gants a été estimée entre 1,1 et

3,8 µg/kg. L'ensemble de ces données soulignent le fait que le port de gant constitue une réelle source d'exposition aux plastifiants dans le cadre de l'exercice professionnel.

Le contexte de multi-exposition aux plastifiants permet de prendre conscience de l'omniprésence des plastifiants dans notre quotidien. Par ailleurs, il convient de considérer les interrelations possibles entre les sources et les voies d'exposition, ce qui complexifie les schémas d'exposition aux plastifiants. Par exemple, les plastifiants adsorbés sur les particules en suspension dans l'air ont été décrits comme étant une source d'exposition par voie inhalée. Toutefois, une exposition par voie orale ou cutanée peut aussi survenir, car ces particules peuvent être ingérées ou se déposer à la surface de la peau (38,64,65,85). De manière analogue, l'exposition aux plastifiants avec les gants à usage professionnel a été présentée pour la voie cutanée. Or elle peut être associée à la voie orale, en raison d'une migration possible des plastifiants dans les aliments qui ont été préparés avec des gants (84).

2. Méthodes d'analyse

Pour prendre la mesure de l'exposition aux plastifiants, les méthodes analytiques constituent des outils indispensables. Elles fournissent des données cruciales concernant l'occurrence des plastifiants au sein de diverses matrices. La procédure analytique se compose de trois étapes successives, à savoir les étapes de préparation de l'échantillon, de séparation et de détection.

Comme évoqué précédemment, les résultats issus des études concernant les différentes sources d'exposition montrent que les plastifiants caractérisés dans les matrices sont rarement isolés. Au contraire, un mélange de plastifiants est généralement retrouvé au sein des échantillons, indépendamment de leur nature. Dans le cadre de l'étude des plastifiants, il convient donc de considérer la diversité des molécules composant la famille des plastifiants et de privilégier les techniques permettant l'analyse simultanée pour distinguer plusieurs composés d'intérêt. Le développement et la validation de ces méthodes sont guidés par plusieurs critères qui vont soutenir les performances analytiques, à savoir :

- des procédures uniques se prêtant à l'analyse simultanée de plusieurs composés ;
- des méthodes simples, reproductibles et rapides qui soient faciles à implémenter en routine au laboratoire ;

- des techniques suffisamment sensibles et précises pour quantifier les analytes d'intérêt ;
- la prise en compte des sources de contamination en raison du caractère ubiquiste des plastifiants.

L'objectif de cette partie est de présenter les méthodes analytiques mises en œuvre pour l'analyse des plastifiants dans les matrices environnementales ou biologiques, en considérant les différentes étapes analytiques.

2.1. Techniques extractives pour la préparation des échantillons

Les échantillons sont rarement analysés tels quels sans procédures extractives au préalable. La phase pré-analytique consiste à préparer les échantillons en amont de leur analyse. Les objectifs de cette étape visent à extraire de manière sélective les analytes d'intérêt à partir de l'échantillon, de concentrer les analytes pour gagner en sensibilité et d'éliminer les interférences pour permettre *in fine* leur détection et leur quantification. Le choix de la procédure extractive va dépendre de la nature des échantillons et des seuils de quantification ciblés.

Il existe différentes techniques extractives dans le cadre de l'étude des plastifiants dans les matrices environnementales ou biologiques. Elles se répartissent en deux catégories principales. D'une part, il y a les techniques dites « classiques » qui sont couramment utilisées en laboratoire, elles regroupent les extractions en phase liquide et en phase solide. D'autre part, il y a les techniques dites « alternatives » qui ont été développées plus récemment, telles que les protocoles d'extraction miniaturisés, accélérés, les extractions en ligne par désorption et les extractions par fluide supercritique. L'ensemble de ces techniques extractives reposent toutes sur un procédé de séparation commun qui a lieu par transfert des analytes présents dans l'échantillon vers une autre phase sans modification chimique.

2.1.1. Techniques classiques d'extraction

2.1.1.1. Extractions en phase liquide

L'extraction est réalisée au moyen de solvants organiques. La capacité extractive des solvants dépend des propriétés physico-chimiques des analytes à isoler. Ainsi, le choix du solvant constitue un paramètre déterminant. Il est conditionné par la solubilité des analytes dans le solvant d'extraction. Selon la nature des échantillons, différentes techniques d'extraction en phase liquide se distinguent telles que les extractions liquide-liquide, l'extraction par immersion et la méthode Soxhlet.

- Les extractions liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide (LLE) est mise en œuvre pour les échantillons sous forme liquide. Pour ce faire, deux phases non miscibles sont mises en contact par agitation, respectivement l'échantillon et le solvant d'extraction. Le principe de la méthode repose sur la décantation pour obtenir la séparation des deux phases (Figure 22).

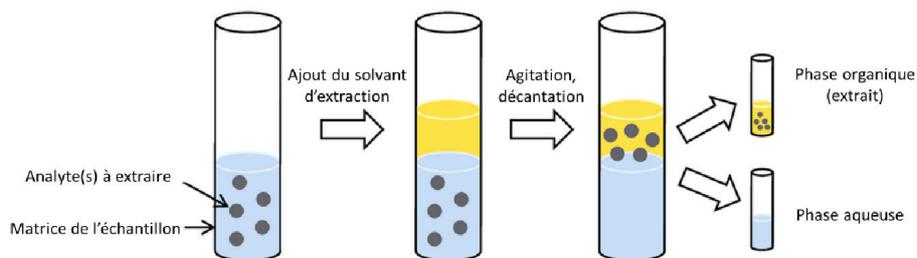


Figure 22 : Illustration du principe de l'extraction liquide-liquide
[In Soares *et al.* (2021) (86)]

La capacité extractive sera d'autant plus importante que les analytes auront une plus grande affinité pour le solvant d'extraction. La technique LLE présente l'avantage d'être simple à mettre en œuvre. Elle est aussi peu onéreuse car elle fait appel à du matériel de laboratoire et à des solvants couramment utilisés (hexane, acétate d'éthyle, éthers, etc.) (87–89). Habituellement, le protocole met en jeu des volumes de solvants de l'ordre de plusieurs dizaines de millilitres. Mais une adaptation de la procédure avec des volumes réduits est envisageable comme cela a été montré lors de l'extraction des plastifiants d'échantillons de sang stockés dans des poches plastifiées (89). Toutefois, plusieurs limites peuvent être relevées. Une extraction unique avec un seul volume de solvant ne permet pas d'extraire de manière suffisante les analytes. C'est pourquoi, la réalisation d'extractions successives est nécessaire afin d'obtenir un meilleur rendement d'extraction, en rassemblant l'ensemble des fractions récupérées. En contrepartie, cela complexifie le mode opératoire avec un allongement de sa durée et avec une utilisation plus importante de solvants, plus ou moins toxiques. Cette méthode n'est pas adaptée pour l'extraction de plusieurs échantillons en parallèle. Aussi, l'étape d'agitation nécessaire au transfert des analytes peut également entraîner une réduction du rendement d'extraction en raison de la formation d'une émulsion. Concernant les champs d'application de la LLE, elle a notamment été appliquée pour l'analyse de matrices aqueuses comme les eaux en bouteille ou les poches servant au stockage des produits sanguins labiles (88,89). Les rendements d'extraction des plastifiants à partir des eaux en bouteille sont compris entre 85 et 96%, selon les analytes (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP et DNOP) (88). Des rendements d'extraction

comparables, autour de 80% pour le DEHP, le DINCH et leurs métabolites monoester respectifs (MEHP et MINCH), ont été rapportés pour des échantillons de plasma contenus dans des poches de sang avec la procédure mettant en jeu de faibles volumes de solvants (quelques millilitres) (89).

L'extraction par la technique QuEChERS (en anglais « Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe »), est une alternative à la LLE. Comme l'indique son acronyme c'est une technique rapide, facile, peu coûteuse, efficace, robuste et sûre. L'extraction est réalisée par un solvant organique en présence de sels et de tampons. Le principe de l'extraction repose sur le transfert des analytes de la matrice aqueuse vers la phase organique. La séparation des deux phases est favorisée par l'ajout d'un excès de sels et de tampons. Après agitation et centrifugation, la fraction enrichie est récupérée. Le principe de la méthode est présenté en figure 23.

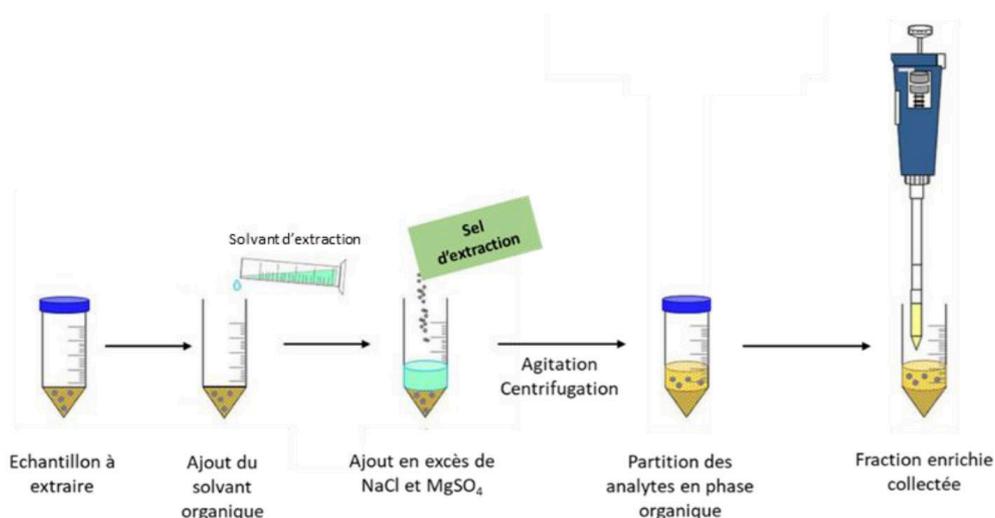


Figure 23 : Illustration du principe de l'extraction par la technique QuEChERS [adaptée de Paíga *et al.* (2015) (90)]

Cette technique d'extraction QuEChERS présente plusieurs avantages. Elle est facile à mettre en œuvre, peu coûteuse car elle nécessite du matériel et des solvants couramment utilisés en laboratoire, comme par exemple l'acétonitrile (91). De plus, elle met en jeu de faibles volumes de solvants. L'inconvénient de cette technique est que des substances interférentes peuvent être extraites avec les analytes ciblés. C'est pourquoi, une étape de purification par extraction en phase solide (SPE) peut être réalisée, dans un second temps, pour éliminer ces substances interférentes. Historiquement, cette méthode a été développée pour l'extraction des pesticides à partir des fruits et des légumes. Depuis, son utilisation s'est étendue à d'autres composés

chimiques comme les plastifiants et à d'autres matrices telles que les boissons alcoolisées et non alcoolisées (91). Pour ces dernières, les rendements d'extraction obtenus sont compris entre 75 et 120% selon les plastifiants (DPP, di(2-methoxyethyl)phtalate, diisopentyl phtalate, diethoxyethyl phtalate, di-n-pentyl phtalate, BBP, di-2-n-butoxyethyl phtalate, DCHP, DNOP, DINP, DIDP, DEHA) (91).

- Les extractions solide-liquide

L'extraction par immersion met directement en contact l'échantillon avec le solvant d'extraction, l'objectif étant de solubiliser les plastifiants dans ce solvant. C'est une méthode simple et facile à mettre en œuvre en routine. Pour les plastifiants, cette méthode ne nécessite pas une destruction de l'échantillon car ils ne sont pas liés de manière covalente. L'extraction par immersion peut être associée à une étape d'agitation par ultrasons ou par micro-ondes afin de favoriser le transfert des analytes en milieu liquide. Toutefois, un phénomène de dissolution de la matrice de l'échantillon solide peut être observé selon la nature du solvant d'extraction utilisé, comme cela a été rapporté pour des dispositifs médicaux en PVC en présence de tétrahydrofurane (75,92). Dans ce cas, une étape supplémentaire de précipitation du PVC par ajout d'éthanol ou de méthanol est nécessaire (75,92,93). L'étape de précipitation du PVC nécessite une étape de filtration pour l'éliminer ou de centrifugation. La filtration est une étape qui peut diminuer le rendement d'extraction. Il est alors possible d'améliorer le rendement d'extraction en procédant à des extractions répétées consécutives mais cela entraîne une consommation de solvants non négligeable et un allongement de la durée de la procédure extractive, d'autant plus que cette technique n'est pas adaptée pour l'extraction de plusieurs échantillons en parallèle (93). L'extraction par immersion a particulièrement été réalisée sur des échantillons de dispositifs médicaux en PVC (75,92,93). D'une manière globale, les rendements d'extraction sont compris entre 78 et 120%, tous plastifiants confondus (75,92). Cependant, les rendements d'extraction des plastifiants sont moins bons, entre 36 et 54%, dans l'étude de Bernard *et al.* (2015) (93). Contrairement aux autres études citées, l'extraction est réalisée dans cette étude par immersion statique, c'est-à-dire sans favoriser le transfert des analytes par une étape d'agitation ou de centrifugation.

La méthode Soxhlet est une procédure d'extraction par reflux qui est réalisée en système fermé, au sein duquel le solvant d'extraction est porté à ébullition. C'est une méthode qui nécessite de travailler à chaud. À la suite de la condensation du solvant dans un réfrigérant, le

solvant d'extraction entre en contact avec l'échantillon par reflux pour se charger en analytes d'intérêt. Le principe de l'extraction par la méthode Soxhlet est présenté en figure 24.

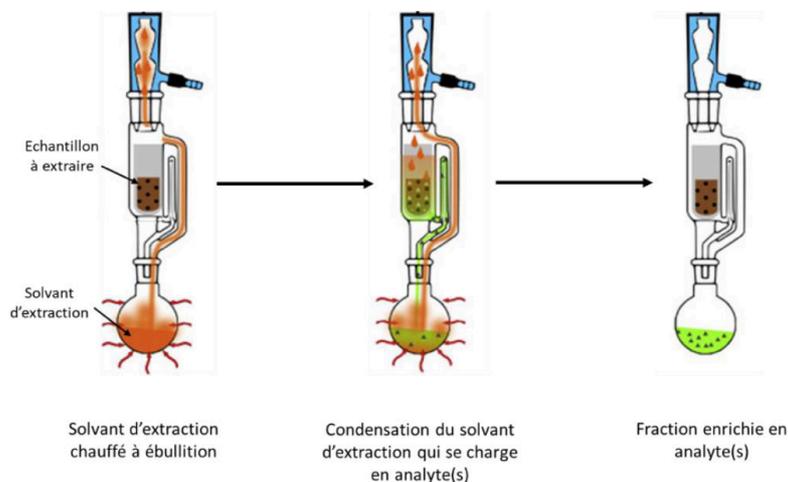


Figure 24 : Illustration du principe d'extraction par la méthode Soxhlet [adaptée de Weggler *et al.* (2020) (94)]

Plusieurs cycles successifs sont nécessaires pour optimiser le rendement d'extraction, par renouvellement du solvant. L'extrait obtenu correspond à la somme des fractions récoltées. Le protocole de cette technique extractive présente l'avantage d'être simple car il est réalisé en système fermé sans étapes opératoires supplémentaires. Cependant, son usage est assez limité car la procédure est particulièrement longue avec la mise en jeu de volumes non négligeables, notamment lors des extractions successives (95). De plus, elle ne permet pas d'extraire plusieurs échantillons en parallèle. La méthode Soxhlet a été utilisée pour extraire les plastifiants à partir de dispositifs médicaux (93). Les rendements d'extraction obtenus au bout de 24 heures d'extraction avec l'acétate d'éthyle sont compris entre 70 et 96,2%, pour tous les analytes confondus (DEHP, DEHT, TOTM et DINCH) (93).

2.1.1.2. Extractions sur phase solide

L'extraction des échantillons sous forme liquide peut également être effectuée par extraction sur phase solide (SPE). Le principe de la SPE est le suivant : les composés à extraire sont adsorbés sur une phase stationnaire contenu dans une cartouche puis, à l'issue de cette étape, ils sont récupérés par élution avec des solvants. La procédure d'extraction comprend quatre étapes successives, à savoir : le conditionnement, la percolation, le lavage et l'élution (Figure 25).

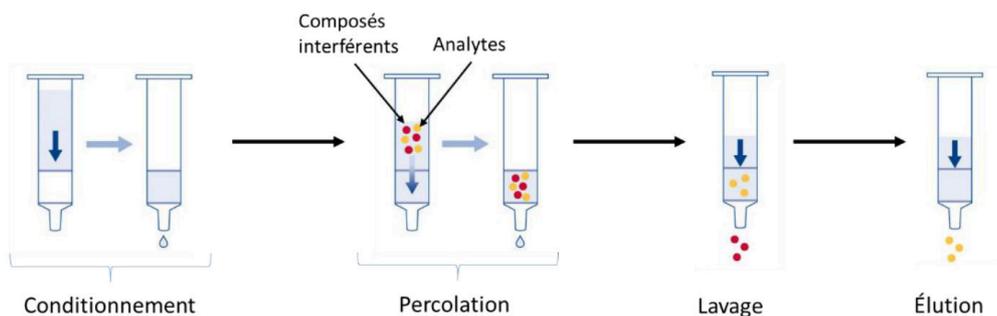


Figure 25 : Illustration du principe de la SPE
[adaptée de : www.mn-net.com]

La rétention des analytes en vue de leur extraction va être conditionnée par la composition de l'analyte et de l'adsorbant. Des phases stationnaires de différentes affinités sont disponibles sur le marché. Cela confère à cette méthode un caractère polyvalent permettant de choisir la phase stationnaire la plus appropriée pour les analytes étudiés. Les adsorbants apolaires obtenus par greffage de la silice avec des chaînes octadécyles sont préférentiellement choisis pour l'extraction des plastifiants. Des solvants avec des forces d'éluion différentielles sont utilisés au cours de la procédure afin d'obtenir une éluion séparée des analytes et des composés interférents (composés issus de l'adsorbant ou de la matrice de l'échantillon). Pour l'éluion des analytes, l'acétonitrile, l'acétate d'éthyle, le méthanol et l'hexane sont couramment utilisés, seuls ou en mélange (96–101). En plus de sa simplicité d'utilisation, l'extraction de plusieurs échantillons en parallèle est rendue possible. L'automatisation de la SPE est possible, ce qui permet de travailler en ligne grâce au couplage avec les appareils d'analyse. De plus, la SPE permet de réduire le nombre d'étapes en combinant l'extraction et la concentration de l'échantillon, comparativement à la LLE pour laquelle des extractions séquentielles sont nécessaires afin d'améliorer le rendement d'extraction. Selon l'objectif visé concernant les niveaux de concentrations ciblés, la SPE peut aussi être mise en œuvre à la suite de l'extraction comme étape supplémentaire pour la purification des échantillons (96,97). Dans le cadre de l'étude des plastifiants, l'inconvénient majeur soulevé par la SPE est que la phase adsorbante présente un risque de relargage de plastifiants comme cela a été caractérisé pour le DIBP, le DBP et le DEHP (102). Aussi, la phase d'optimisation pour chaque étape de la procédure (conditionnement, dépôt, rinçage et éluion) peut être complexe. La SPE a par exemple été utilisée pour déterminer les niveaux de concentrations de plastifiants dans les matrices environnementales aqueuses, comme par exemple dans la baie de Marseille et dans le Rhône (98,100). L'extraction avec l'acétate d'éthyle a permis d'obtenir des rendements d'extraction

compris entre 81 et 100%, pour tous les plastifiants confondus (DMP, DEP, phtalate de dipropyle (DPP), DIBP, DBP, BBP, DEHP et DNOP).

Les techniques d'extraction dites « classiques » font appel le plus souvent à des solvants organiques, du matériel et des équipements couramment utilisés en laboratoire. Ces extractions sont généralement réalisées à température ambiante, excepté pour la méthode Soxhlet dont le procédé nécessite obligatoirement une étape de chauffage. Par ailleurs, cette méthode ne permet pas de travailler avec des mélanges de solvants contrairement aux autres méthodes. Pourtant, afin d'extraire une diversité de molécules, ces mélanges offrent la possibilité de moduler la capacité extractive de la technique par la combinaison d'au moins deux solvants. Les mélanges de solvants binaires sont d'ailleurs fréquemment utilisés pour l'extraction des plastifiants (71,88,103). Un des freins de la méthode Soxhlet et de la LLE est qu'il est nécessaire de réaliser plusieurs cycles d'extraction successifs pour obtenir de bons rendements d'extraction. Alors que pour l'extraction par immersion et la SPE, il est possible d'effectuer des extractions uniques et avec la prise en charge de plusieurs échantillons en parallèle. Mais les protocoles opératoires peuvent s'avérer complexes et longs avec la mise en jeu de volumes de solvants non négligeables, de l'ordre de plusieurs dizaines de millilitres (68,75). De plus, les solvants utilisés sont plus ou moins toxiques, comme par exemple l'usage du méthanol (96,104). C'est pourquoi, à côté de ces techniques extractives dites « classiques », d'autres méthodes ont peu à peu émergé. Ce sont des variantes dont les développements sont relativement récents et dont l'usage tend à se répandre.

2.1.2. Techniques d'extraction alternatives

Les techniques d'extraction alternatives répondent aux objectifs de la chimie verte, avec des procédures extractives plus respectueuses de l'environnement. En pratique, la durée d'extraction est moins longue et les volumes de solvants utilisés sont réduits, en privilégiant les solvants moins toxiques. Cela est rendu possible avec la mise en œuvre de procédures miniaturisées, accélérées et en ligne ou au moyen d'un fluide supercritique. Elles seront abordées ici car elles ont été décrites pour l'extraction des plastifiants dans les matrices environnementales.

2.1.2.1. Technique d'extraction accélérée

L'extraction accélérée par solvant (ASE), également connue sous le nom d'extraction liquide sous pression ou encore d'extraction par un solvant chaud sous pression, est une technique utilisée pour l'extraction des plastifiants à partir d'échantillons solides. Les techniques extractives accélérées présentent la particularité de travailler avec des températures élevées et sous pression. Le principe de l'ASE est présenté en figure 26.

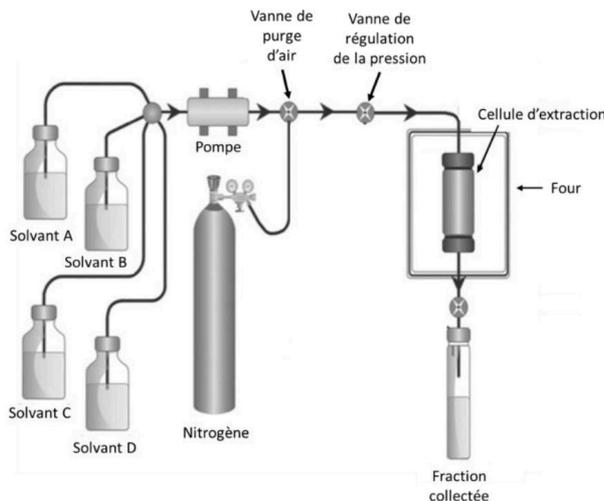


Figure 26 : Illustration du principe de l'ASE [adaptée de Turner and Waldebäck (2013) (105)]

Cette technique a l'avantage d'être rapide car le solvant d'extraction est chauffé pour améliorer la solubilité des analytes. Comme cela est illustré en figure 26, il est possible de travailler avec un mélange de solvants. L'éthanol, l'acétone, l'hexane ou encore l'acétate d'éthyle sont généralement utilisés (106). Il est nécessaire de travailler sous pression pour maintenir le solvant dans un état liquide, ce qui permet une faible consommation de solvant (107). L'avantage de l'ASE a été montré expérimentalement puisque l'extraction de ces plastifiants à partir de matériaux en PVC a été obtenue avec 20 ml d'éther de pétrole en 12 minutes alors que des rendements comparables sont obtenus par l'extraction Soxhlet avec 120 ml de solvant au bout de six heures (108). Afin de pouvoir travailler avec de telles conditions opératoires, l'ASE requiert des équipements spécifiques mais tous les laboratoires n'en sont pas forcément équipés, ce qui constitue la principale limite d'utilisation de cette technique.

À titre d'exemple, l'extraction de plastifiants à partir de sédiments de sols a été effectuée à 100°C et à 1600 psi, avec trois cycles successifs d'une durée de 10 minutes chacun (106). Des conditions comparables (100°C, 1500 psi) ont été appliquées pour l'extraction de plastifiants

(DEHP, TOTM, l'adipate de di-2-éthylhexyle et le phosphate de tris-2-éthylhexyle) à partir du PVC (108). L'extraction des échantillons de sédiments de sols par ASE avec l'éthanol a permis d'obtenir des rendements d'extraction compris entre 79 et 112%, pour tous les plastifiants confondus (dont DMP, DEP, DBP, phtalate de dicyclohexyle, BBP, DEHP et DNOP) (106).

2.1.2.2. Techniques d'extraction miniaturisées

La micro-extraction dispersive liquide-liquide (DLLME) est une technique d'extraction miniaturisée (109). Elle est mise en œuvre pour l'extraction des plastifiants à partir des matrices liquides relativement aqueuses. Elle consiste à ajouter à l'aide d'une seringue un très faible volume de solvant d'extraction à la matrice d'étude, de l'ordre du microlitre, de manière rapide afin d'obtenir une émulsion. La formation de cette émulsion est un élément déterminant pour l'extraction car elle réduit l'étape d'équilibration des analytes entre les deux phases. Au cours de l'extraction, le recours à un solvant dispersant et/ou à une étape d'agitation mécanique va permettre de stabiliser l'émulsion et donc d'augmenter le temps de contact avec l'échantillon. Après une étape de centrifugation, la fraction enrichie est collectée. Le principe de la DLLME est présenté en figure 27, pour le cas d'un solvant d'extraction plus dense que la phase aqueuse de l'échantillon.

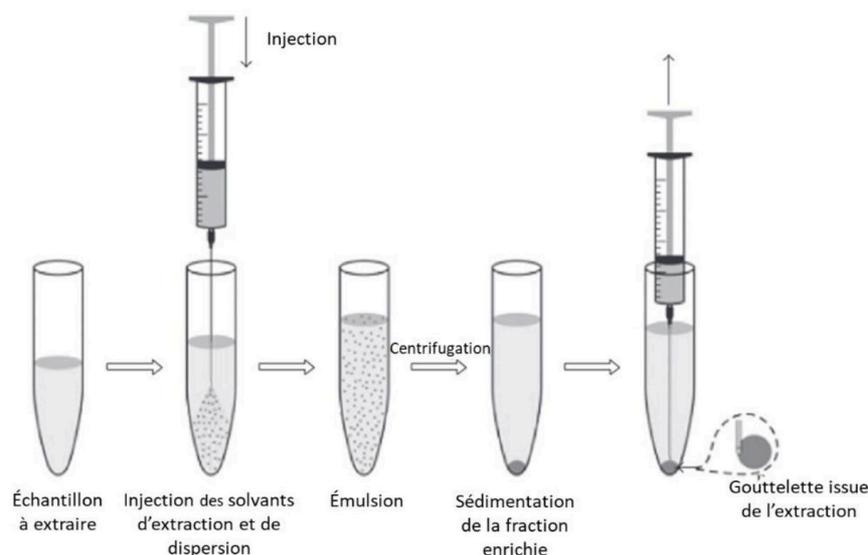


Figure 27 : Illustration du principe de la DLLME
[In Quigley *et al.* (2016) (110)]

Parmi les solvants usuellement utilisés, il y a le dichlorométhane, le chloroforme et l'heptane. La DLLME mobilise du matériel et des équipements couramment utilisés en laboratoire. C'est

une méthode miniaturisée car elle nécessite un faible volume de solvant d'extraction, de l'ordre de quelques centaines de microlitres. Elle est simple, rapide d'exécution et elle peut être réalisée en ligne par couplage avec les appareils d'analyse. La DLLME présente aussi l'avantage de pouvoir concentrer les échantillons (109). Cependant des volumes d'échantillons nécessaires de 10 ml ont été rapportés pour cette technique extractive (101,111). Une autre limite soulevée est la reproductibilité de la formation de l'émulsion, toutefois le recours à l'automatisation permet d'améliorer ce paramètre (109). Concernant les champs d'application de la DLLME, elle a été mise en œuvre pour l'extraction des plastifiants à partir de boissons et de produits d'hygiène (67,101,111). À titre d'exemple, les rendements d'extraction obtenus avec cette méthode pour les plastifiants dans les boissons chaudes issues des distributeurs à boissons ont été rapportés entre 70 et 104%, tous plastifiants confondus (dont DMP, DEP, DIBP, BBP, DEHP et DNOP) (101).

La micro-extraction en phase solide (MEPS) s'apparente à une miniaturisation de la SPE. Elle se présente sous la forme d'une seringue avec deux configurations possibles : soit l'adsorbant est directement inséré dans le corps de la seringue, soit une cartouche est fixée au niveau de l'aiguille (Figure 28). Le prélèvement de l'échantillon et l'extraction sont tous deux réalisés avec la même seringue. La MEPS repose sur le même principe que la SPE, c'est-à-dire que les analytes sont adsorbés sur une phase stationnaire solide puis ils sont ensuite récupérés par élution à l'aide de solvant(s).

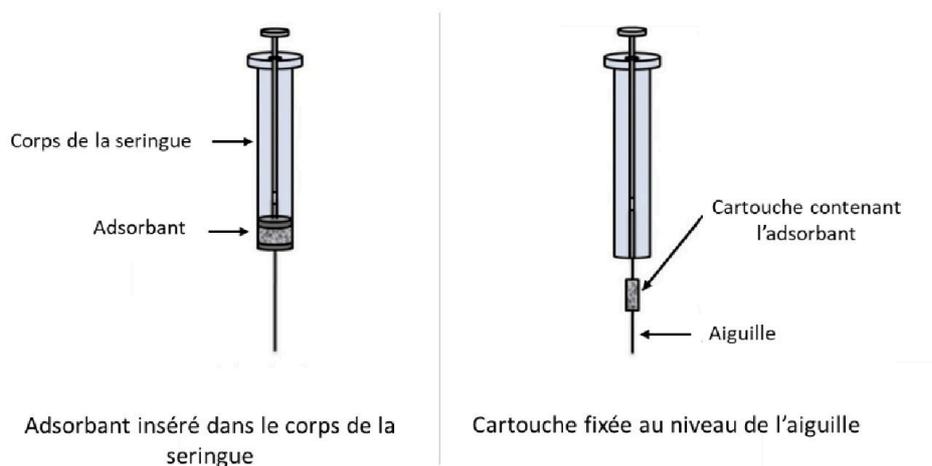


Figure 28 : Illustration des deux configurations de la seringue utilisée pour la MEPS
[In Casado *et al.* (2020) (112)]

Les polarités de phases stationnaires commercialisées sont similaires à celles utilisées en SPE, avec des phases inverses comme par exemple pour l'extraction de molécules apolaires et des phases normales pour extraire les molécules polaires (113,114). La MEPS est une technique simple, rapide et elle permet de concentrer l'échantillon. Elle permet de travailler avec des volumes d'échantillon allant d'une dizaine de microlitres au millilitre. De plus, c'est une technique à faible impact environnemental car d'une part elle nécessite de faibles volumes de solvant pour l'extraction (de l'ordre du microlitre), ce qui est rendu possible grâce à la faible quantité d'adsorbant (quelques milligrammes). D'autre part la seringue/cartouche peut être réutilisée une centaine de fois comme cela a été rapporté avec des échantillons biologiques, contrairement à la cartouche SPE qui est à usage unique (113). La MEPS présente aussi l'avantage de pouvoir être réalisée en ligne par couplage avec les systèmes chromatographiques comme la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase liquide (LC) par exemple. De plus, son automatisation est possible. Avec des résultats d'extraction comparables (sensibilité et spécificité), la MEPS est une technique qui est moins coûteuse que la SPE (113). Le frein de cette technique est commun à la SPE, il s'agit de la phase d'optimisation pour chaque étape de la procédure (conditionnement, dépôt, rinçage et élution). L'extraction des plastifiants est incluse dans le champ d'applications de la MEPS comme cela a été rapporté par Kaur *et al.* (2015) (115). Dans cette étude, l'extraction de plastifiants à partir de boissons, de parfums et de cosmétiques a été réalisée avec l'acétate d'éthyle ($3 \times 10 \mu\text{l}$) sur un adsorbant de phase apolaire en C18 (115). Dans cette étude, les rendements d'extraction obtenus sont très variables, ils sont compris entre 88 et 184%. Les résultats sont matrice-dépendants, car les meilleurs rendements sont obtenus pour les boissons (entre 92 et 99%).

2.1.2.3. Techniques de micro-extraction en ligne par désorption

Les techniques de micro-extraction en ligne sont des techniques qui visent à extraire les composés volatils en combinant les étapes d'extraction et d'injection. Les analytes sont désorbés soit directement par chauffage (désorption thermique), soit après adsorption sur un film polymérique (par adsorption-désorption).

- Micro-extraction par désorption thermique

La micro-extraction par désorption thermique (TD) est une technique d'extraction qui comporte une seule étape et qui est réalisée en ligne par couplage avec l'injecteur du chromatographe, ce qui permet de combiner l'extraction et l'injection. Les échantillons peuvent

être placés directement dans un tube de désorption pour les échantillons solides, ou déposés sur un support solide placé dans le tube pour les échantillons liquides. Ce tube est ensuite chauffé et traversé par un gaz vecteur afin de transporter les composés volatils vers l'injecteur du chromatographe. Le principe de la micro-extraction par désorption thermique est illustré en figure 29.

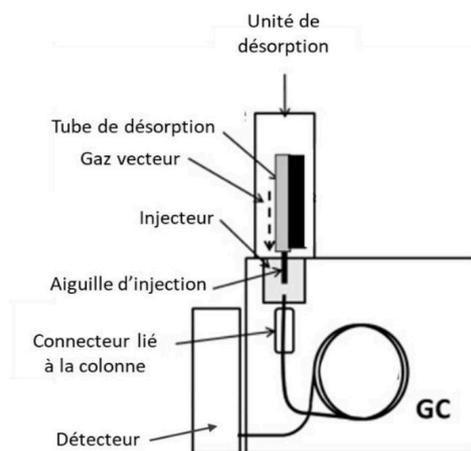


Figure 29 : Illustration du principe de la micro-extraction par TD
[In Li *et al.* (2017) (116)]

Le protocole d'extraction comporte une seule étape opératoire ce qui le rend simple et facile à mettre en œuvre. Cette technique présente aussi l'avantage d'être réalisée en système fermé. Aussi, l'automatisation de la technique permet d'obtenir des résultats reproductibles. Cependant, la technique d'extraction par TD n'est pas adaptée aux composés non volatils. De plus, elle nécessite d'avoir à disposition cette unité de désorption. Cette technique a notamment été décrite pour l'extraction de plastifiants à partir de matériaux polymériques (117). Dans cette étude, les rendements d'extraction obtenus sont compris entre 80 et 120% globalement, pour tous les plastifiants confondus (DIBP, DBP, BBP, DEHP, DNOP, DINP et DIDP).

- Micro-extractions par adsorption-désorption

Les techniques de micro-extraction par adsorption-désorption sont quant à elles réalisées au moyen d'un film polymérique pour l'extraction des composés volatils. Le polymère adsorbant peut se présenter sous deux formes, soit par revêtement d'une fibre, de silice ou de graphène par exemple, qui est insérée dans une aiguille dans le cadre de la micro-extraction en phase solide (SPME), soit par recouvrement d'un barreau d'extraction en verre pour les extractions par adsorption en espace de tête (HSSE) et par adsorption sur un barreau d'agitation (SBSE).

Pour la technique SPME, l'échantillon à extraire est placé dans un récipient clos. L'étape de prélèvement peut avoir lieu selon deux modes opératoires : soit par introduction de l'aiguille dans l'espace de tête du récipient, soit par immersion de l'aiguille dans l'échantillon. Les molécules chargées sur la fibre sont ensuite désorbées en ligne sous l'action de la chaleur directement dans l'injecteur du chromatographe. Le principe de la technique SPME est présenté en figure 30.

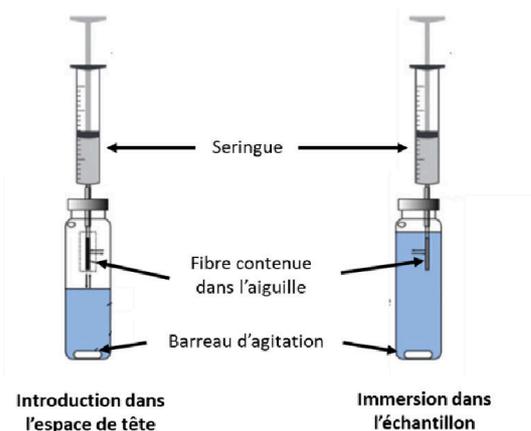


Figure 30 : Illustration des deux modes de prélèvement par SPME [adaptée de Laaks *et al.* (2012) (118)]

Les conditions opératoires sont modulables car des applications à température ambiante et à 90°C ont été décrites dans le cas des plastifiants, pour l'extraction des plastifiants à partir de denrées alimentaires et de matrices aqueuses avec des durées d'immersion allant de 25 à 60 min (119–121). L'extraction par SPME présente l'avantage d'être simple et rapide, avec la possibilité de réutiliser la fibre plusieurs dizaines de fois (122,123). La technique en ligne permet l'introduction directe de l'échantillon. Les inconvénients liés à cette technique sont les problèmes de reproductibilité des résultats liés à l'endommagement de la fibre, lié à la fois à la nature de la fibre et de l'échantillon (122). Cela peut impacter la reproductibilité de l'extraction (95,120). Aussi, les durées d'extraction peuvent être longues car une durée de 50 min a été considérée comme étant optimale pour l'extraction des phtalates dans des échantillons de poissons issus du commerce (119). En pratique, la SPME a permis d'obtenir pour des échantillons d'eaux en bouteille des rendements d'extraction entre 79 et 105%, pour tous les plastifiants confondus (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DINP, DNOP et DIDP) (121,123).

Pour les techniques HSSE et SBSE, l'extraction est réalisée à l'aide d'un barreau d'extraction. Il est placé dans le récipient qui contient l'échantillon à extraire. Le barreau est positionné dans l'espace de tête en HSSE alors qu'il est directement introduit dans l'échantillon

liquide pour la SBSE (Figure 31). Ensuite, le système est ouvert afin de récupérer le barreau d'extraction. Puis la désorption est réalisée en ligne dans l'injecteur du chromatographe par désorption thermique. À titre d'information, il est également possible pour la SBSE de réaliser l'injection en milieu liquide, à la suite d'une étape d'extraction à l'aide de solvants par un transfert des analytes à partir du barreau.

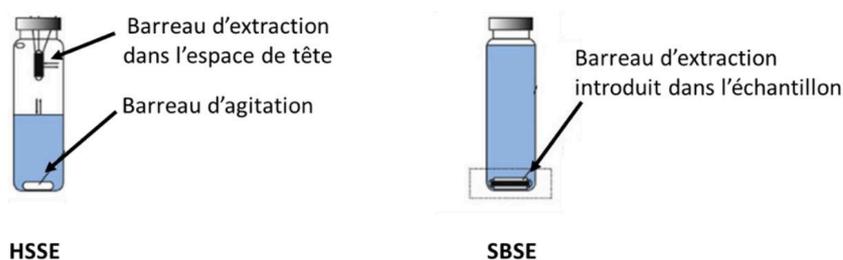


Figure 31 : Illustration du barreau d'extraction utilisé en HSSE et en SBSE [d'après Laaks *et al.* (2012) (118)]

Parmi les avantages de ces méthodes en ligne, il y a le fait qu'elles peuvent être automatisées ce qui rend ces techniques faciles à mettre en œuvre car la procédure comporte peu d'étapes et elles nécessitent très peu de volume de solvant voire aucun. De plus, cette technique extractive peut être utilisée pour concentrer l'échantillon et le barreau d'extraction peut être réutilisé ultérieurement pour d'autres extractions à la suite d'une étape de reconditionnement (124). Pour les échantillons solides, des étapes de broyage et dissolution sont nécessaires en amont pour pouvoir utiliser ces techniques. En pratique, ces techniques sont assez peu utilisées pour l'extraction des plastifiants, comparativement à la SPME. En effet, l'optimisation des rendements d'extraction est conditionnée par une étape d'agitation assez longue, par exemple de quatre heures comme cela a été rapporté par les travaux de Cacho *et al.* (2012) (124). À titre d'exemple, la SBSE a été appliquée aux matrices végétales et elle a permis d'obtenir des rendements d'extraction compris entre 83 et 119%, pour tous les plastifiants confondus (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP et DNOP) (124).

2.1.2.4. Extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique (SFE) est une technique qui n'a pas recours aux solvants organiques mais à un fluide supercritique. Le dioxyde de carbone (CO₂), principalement utilisé, est chauffé et comprimé au-delà de son point critique. L'état supercritique est un état intermédiaire entre l'état gazeux et l'état liquide. Dans de telles

conditions, le fluide supercritique présente des propriétés particulières car il se caractérise par une faible viscosité et une densité élevée. Ces caractéristiques expliquent sa bonne diffusivité et sa capacité extractive. La sélectivité de l'extraction repose sur la solubilité des composés d'intérêt dans le fluide supercritique. Le pouvoir solvatant du CO₂ est fonction de la température et de la pression appliquées. Par exemple, pour l'extraction des plastifiants dans des matrices en PVC, les conditions optimales ont été définies comme suit : une température et une pression comprises entre 90 et 100°C et entre 30 et 50 MPa respectivement, et une durée d'extraction de 30 min (125,126). Il est également possible de modifier les propriétés du solvant supercritique par l'ajout d'un solvant, comme par exemple le méthanol (127). La SFE est une technique innovante, qui répond aux enjeux de la chimie verte. En effet, elle nécessite peu voire pas de solvant, et le CO₂ utilisé est un gaz non toxique et avec un haut degré de pureté. Par ailleurs, le CO₂ peut être recyclé en fin d'extraction soit par recompression du CO₂, soit par liquéfaction du CO₂ comprimé. Ce recyclage est notamment effectué dans le cadre d'applications industrielles de la SFE (128). En dépit de ses nombreux avantages, les coûts liés aux équipements constituent un frein majeur expliquant pourquoi cette technique est peu répandue à ce jour. De plus, l'étude d'optimisation est complexe en raison des nombreux paramètres à considérer (127,129). Pour autant, son application dans diverses matrices comme par exemple les matériaux en PVC, poussières intérieures et les emballages alimentaires a montré l'intérêt de cette technique pour l'étude des plastifiants (125–127,130). À titre d'illustration, les rendements d'extraction à partir de matériaux en PVC sont compris entre 85 et 91%, pour tous les plastifiants confondus (dont ATBC et DEHA) avec les conditions opératoires suivantes : 95°C, 46,1 MPa, 30 minutes (126). Par ailleurs, une étude a montré l'usage versatile de la SFE en raison du caractère non destructif, puisqu'elle permet d'éliminer différents plastifiants présents à l'état de contaminants (DIBP, DBP et DEHP) dans les spores d'un champignon (reishi) utilisé en médecine traditionnelle asiatique (131).

Les techniques extractives alternatives sont compatibles avec les systèmes de détection classiques. Elles s'appliquent aussi bien aux échantillons liquides, solides que gazeux. Par rapport aux techniques traditionnelles, leurs modes opératoires s'inscrivent dans une démarche plus écoresponsable. En effet, elles nécessitent de faibles volumes de solvants, voire elles peuvent s'en affranchir dans certains cas comme par exemple lors des extractions par TD, par SPME, par SBSE et HSSE ainsi que par SFE. De plus, ce sont des techniques qui peuvent être considérées comme durables, car la fibre utilisée pour les micro-extractions en ligne et la cartouche utilisée en MEPS peuvent être réutilisées et le CO₂ utilisé en SFE peut être recyclé.

Dans l'ensemble, ce sont des techniques robustes et assez faciles à mettre en œuvre. Le protocole peut être simplifié par rapport aux techniques conventionnelles puisqu'elles comportent souvent un nombre réduit d'étapes. Les extractions par TD, par SPME, par SBSE et HSSE, et par MEPS sont les plus avancées sur ce point car elles permettent de coupler l'extraction et l'injection. Tout cela concourt à limiter les contributions externes, qui sont sources de contamination (cf Chapitre 2, §2.2.5. Sources de contamination externes et contrôles analytiques). Toutefois, ces techniques ne sont pas toujours utilisées en premier recours car elles nécessitent de disposer de ces équipements spécifiques et qui peuvent être très onéreux comme par exemple pour le cas de la SFE. Cela explique en partie pourquoi les techniques extractives dites « classiques » sont privilégiées pour l'extraction des plastifiants car elles sont adaptées pour des applications en routine dans les laboratoires avec des rendements d'extraction satisfaisants.

2.2. Méthodes d'identification et de quantification

Dans l'arsenal analytique, il convient de distinguer deux catégories de techniques d'analyse, d'une part les techniques d'analyse directes et d'autre part les techniques d'analyse indirectes. Les techniques analytiques vont être présentées en considérant successivement l'une et l'autre de ces catégories. Dans un premier temps, les différentes méthodes d'analyse vont être abordées, en s'attachant à décrire les principaux appareils analytiques utilisés dans le cadre de l'analyse des plastifiants. Puis, une comparaison des performances analytiques de ces techniques sera présentée.

2.2.1. Méthodes d'analyse directes

Les méthodes d'analyse directes permettent de caractériser les composés directement dans la matrice. Elles sont faciles à mettre en œuvre et elles ne nécessitent pas de procéder à une étape d'extraction au préalable sauf pour en améliorer les performances, ni à une étape de séparation chromatographique des composés à analyser.

2.2.1.1. Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode d'analyse directe. Le principe de la RMN est basé sur l'enregistrement de mesures électromagnétiques. Elle permet d'obtenir des informations d'ordre qualitatif et quantitatif sur la composition chimique des échantillons.

Cette technique s'applique autant aux échantillons solides qu'aux échantillons liquides. Son champ d'application inclut l'analyse des adjuvants dans les matrices polymériques comme les plastifiants (129,132). La RMN est une technique d'analyse répandue car de nombreux laboratoires en sont équipés. C'est une méthode non destructive car l'échantillon est conservé intact à la fin de l'analyse. Cette technique se caractérise par une bonne spécificité comme cela a été apprécié par la distinction entre deux isomères de position, que sont le DEHP et le DEHT (129). Cependant, la RMN est une technique peu sensible puisqu'elle ne permet pas de quantifier de faibles teneurs de plastifiants. À titre d'exemple, des teneurs de DEHP inférieures à 10% n'ont pas pu être détectées dans le PVC par RMN (129). Pourtant, récemment, des optimisations analytiques ont permis de quantifier par RMN les plastifiants minoritaires (0,1% massique) dans les dispositifs médicaux avec des limites de détection et de quantification de l'ordre du µg/ml, en plus de ceux majoritaires, grâce à une étape de préparation de l'échantillon (132). Les principaux freins concernant l'utilisation de la RMN sont liés au coût de l'appareillage, aux durées d'analyse plus ou moins longues comme cela a été rapporté pour l'analyse de sept plastifiants (DEHP, DEHT, TOTM, ATBC, DEHA, DINP et DINCH) en 20 minutes (132). Aussi, de solides connaissances techniques sont nécessaires.

2.2.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une autre technique d'analyse directe. La FTIR est une technique basée sur l'enregistrement des données spectrales d'un échantillon, ce qui va permettre de le caractériser chimiquement. Elle s'applique aux échantillons solides, liquides et gazeux. Elle a notamment été mise en application pour l'étude des plastifiants (DMP, DBP, BBP, DEHP et DNOP) dans les matériaux à usage alimentaire et pharmaceutique (133). La FTIR est une technique qui présente plusieurs avantages, elle est non destructive, rapide et peu coûteuse. Elle est le plus souvent utilisée pour obtenir des informations qualitatives sur la composition des échantillons, bien que la quantification soit rendue possible avec cette technique. Pour cela, elle nécessite d'avoir recours à un matériau de référence pour la quantification, contrairement à la RMN (129). De plus, l'analyse quantitative fournit une information sur la teneur totale en plastifiants des échantillons, par exemple les teneurs en plastifiants ont été quantifiées entre 5 et 25% dans les matériaux à usage alimentaire et pharmaceutique (133). Une seconde méthode d'analyse est donc requise pour caractériser la nature des plastifiants.

Pour l'analyse des plastifiants, les méthodes dites « directes » sont relativement peu utilisées par rapport aux méthodes d'analyse indirectes. Une des raisons à cela est que ces méthodes d'analyse dites « directes » sont peu sensibles. Elles peuvent être utilisées en premier recours pour réaliser un criblage pour obtenir des informations sur la composition chimique des échantillons. Cependant, pour une caractérisation plus précise (identification et/ou quantification), il est nécessaire d'avoir recours à des techniques analytiques plus performantes. Les techniques chromatographiques de partage par couplage avec différents modes de détection en font partie et ce sont par ailleurs celles-ci qui sont couramment utilisées en routine pour l'analyse des plastifiants.

2.2.2. Méthodes d'analyse indirectes par couplage avec la chromatographie de partage

Les techniques chromatographiques de partage permettent de séparer plusieurs composés en mélange. Le principe de séparation est basé sur la différence de partage des analytes entre deux phases, à savoir une phase stationnaire et une phase mobile. La phase stationnaire est contenue dans une colonne et elle est composée d'un support qui présente une certaine affinité avec les composés à analyser. La phase mobile est soit à l'état gazeux dans le cas de la chromatographie en phase gazeuse (GC), soit à l'état liquide pour la chromatographie en phase liquide (LC), soit à l'état d'un fluide supercritique pour la chromatographie en fluide supercritique (SFC). Elle circule dans la colonne chromatographique afin de permettre la migration des analytes jusqu'au détecteur. L'élution des composés repose donc sur un équilibre dynamique entre la phase stationnaire et la phase mobile qui est lié à leurs propriétés physico-chimiques.

2.2.2.1. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est une technique séparative utilisant une phase mobile à l'état gazeux pour la séparation de molécules en mélange. Les échantillons sont dans un premier temps vaporisés dans l'injecteur, puis entrent dans la colonne chromatographique par entraînement de la phase mobile, un gaz inerte appelé gaz vecteur (généralement l'hélium). La séparation est réalisée sur une colonne capillaire placée dans un four. Cette technique séparative s'applique aux molécules qui sont volatiles à semi-volatiles et qui sont thermostables. La rétention des analytes est régie par la nature de la phase stationnaire ainsi que par la température d'ébullition des analytes. La température de la phase stationnaire est un autre paramètre qui influence l'élution des analytes. En GC, la séparation simultanée de plusieurs

composés en mélange est souvent réalisée en mode gradient en faisant varier la température du four au cours du temps afin d'obtenir une séparation optimale avec un temps d'analyse réduit. Pour l'analyse des plastifiants, les colonnes chromatographiques majoritairement utilisées en GC sont les colonnes capillaires de phase stationnaire apolaire composée d'un film de polysiloxane fonctionnalisé par des groupes phényles et méthyles, principalement phényle (5%) – méthylpolysiloxane (95%) (68,71,75,87,88,91,96,101,103,117,120,121,131,134). Les colonnes capillaires commercialisées sont de longueurs variables ce qui permet de moduler la rétention des analytes. Concernant les dimensions des colonnes utilisées en GC dans le cadre des études sur les plastifiants, leur longueur est comprise entre 15 et 30 m, avec un diamètre interne de 0,25 mm principalement et une épaisseur de film entre 0,05 et 0,25 μm . La GC est une technique qui est utilisée en routine pour l'analyse des plastifiants dans diverses matrices comme par exemple dans les matrices aqueuses, les cosmétiques et les dispositifs médicaux (68,71,75,87,88,96,120,121,134). La GC est une technique répandue car de nombreux laboratoires en sont équipés. L'avantage de la GC est que la séparation est réalisée sans consommation de solvants. De plus, la séparation de mélange complexe en GC est obtenue avec des temps acceptables pour des applications en routine, avec des durées d'analyse inférieures à une heure, généralement comprises entre 15 et 35 min selon le nombre de plastifiants en mélange (68,75,87,88,91,96,101,103,117,120). Pour autant, la GC présente plusieurs limites. L'hélium de haute pureté, qui est utilisé comme gaz vecteur, est coûteux et se raréfie. De plus, l'analyse des échantillons en GC requiert une étape de préparation de l'échantillon en amont de l'analyse afin d'éliminer les substances interférentes et éventuellement pré-concentrer les échantillons. Ce temps de préparation de l'échantillon est à considérer car il peut allonger de manière non négligeable la procédure analytique. Un autre inconvénient en GC est que la séparation est réalisée à température élevée ce qui ne convient pas à l'analyse des molécules thermolabiles.

2.2.2.2. Chromatographie en phase liquide

La chromatographie en phase liquide (LC) permet de séparer des analytes en mélange au moyen d'une phase mobile liquide qui est composée d'un mélange de solvants. Elle est applicable aux échantillons liquides et représente une alternative à la GC car elle permet l'analyse des molécules non volatiles et/ou thermolabiles. La chromatographie de partage en phase inverse est majoritairement utilisée pour l'étude des plastifiants (88,89,96,104,106,111,119,135). Pour ce type de chromatographie, les colonnes utilisées sont

apolaires car elles présentent une meilleure affinité pour la rétention des plastifiants, qui sont des molécules relativement apolaires. D'une manière générale, ce sont des colonnes de phase inverse composées d'une phase stationnaire en silice greffée par des groupements alkyles de longueur variable (C8 et C18 le plus souvent) ou par des groupes phényles qui sont les plus utilisées pour la séparation des plastifiants. Les dimensions des colonnes employées en LC se caractérisent, d'après la littérature, par une longueur comprise entre 1 et 15 cm, un diamètre interne allant de 2,1 à 4,6 mm et une granulométrie comprise entre 1,7 et 10 μm (88,96,104,106,111,119). Il est possible de chauffer la colonne afin d'améliorer l'efficacité de la colonne. La phase mobile utilisée pour la chromatographie de partage en phase inverse est composée d'eau et de solvants organiques tel que l'acétonitrile ou le méthanol (88,89,104,106,111,135). En LC, la séparation des analytes peut être réalisée selon deux modes : soit en mode isocratique c'est-à-dire en maintenant constantes les proportions de solvants de la phase mobile, soit en mode gradient en faisant varier les proportions de la phase mobile au cours du temps. Le mode gradient est le plus utilisé pour l'analyse simultanée de plusieurs plastifiants car il permet d'augmenter la force éluante au cours du temps. Ainsi, la séparation de plusieurs plastifiants en mélange est obtenue avec des durées d'analyse acceptables en routine car étant inférieures à une heure, généralement compris entre 10 et 30 minutes en fonction du nombre de plastifiants en mélange (88,89,96,104,106,111,119). Tout comme la GC, la LC présente l'avantage d'être couramment utilisée dans de nombreux laboratoires. Toutefois, c'est une technique pour laquelle la consommation de solvants organiques n'est pas négligeable. Une autre limite de cette technique est qu'elle ne peut pas être couplée avec tous les détecteurs car il faut que la phase mobile soit compatible avec le détecteur. Cela conditionne la préparation de l'échantillon puisque la solution injectée doit être soluble dans la phase mobile. Aussi, une étape de purification voire une étape de pré-concentration sont nécessaires avant leur analyse, comme pour la GC.

2.2.2.3. Chromatographie en fluide supercritique

La chromatographie en fluide supercritique (SFC) est une alternative aux techniques chromatographiques dites classiques, à savoir la GC et la LC. La SFC est une technique dont la phase mobile est composée d'un fluide supercritique, habituellement le dioxyde de carbone (CO_2). L'état supercritique est obtenu au-delà du point critique de la matière, correspondant à des conditions de température et de pression bien définies (Figure 32).

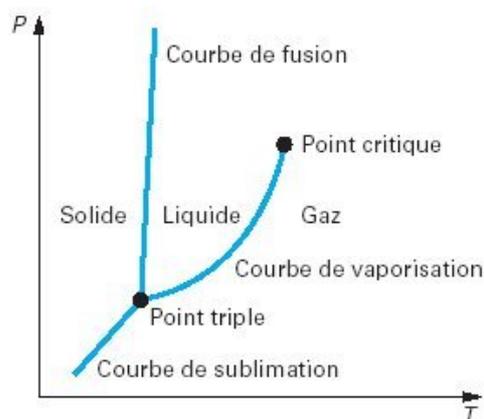


Figure 32 : Représentation générale du diagramme de phases d'un corps pur
[Source : www.direns.mines-paristech.fr]

Par exemple, le point critique du CO_2 correspond à une température de 31°C et à une pression de 73,8 bars (136). Dans cet état, la matière se caractérise par des propriétés intermédiaires entre l'état liquide et l'état gazeux, c'est-à-dire qu'elle présente une viscosité qui s'apparente à celle d'un gaz et une densité similaire à celle d'un liquide. Ces propriétés confèrent au liquide supercritique une bonne diffusivité permettant son interaction avec les analytes ainsi qu'une bonne capacité de solvation de ces analytes. Par analogie avec la SFE précédemment citée, la polarité du fluide supercritique qui est apolaire peut être modifiée par l'ajout d'un solvant tel que le méthanol, ou d'un mélange de solvants comme par exemple un mélange d'heptane et de chloroforme (137–139). La SFC est une technique qui répond aux enjeux de la chimie verte car d'une part elle permet de travailler sans solvant ou éventuellement avec peu de solvant. D'autre part, le CO_2 est un gaz non toxique et qui est peu onéreux ce qui explique son moindre coût en routine comparativement à la LC. Pour autant, l'optimisation de la séparation peut s'avérer fastidieuse ce qui présente un frein à cette technique. Ainsi, malgré son application qui tend à se développer, la SFC est une technique chromatographique relativement peu utilisée par rapport à la GC et à la LC. Ce constat s'avère particulièrement vrai pour le cas des plastifiants puisque le nombre d'études associées est relativement limité dans la littérature (137–139). Par exemple, la SFC a été mise en pratique pour l'analyse des plastifiants dans les eaux en bouteille et dans les dispositifs médicaux avec une durée d'analyse d'une dizaine de minutes pour les deux études (137,138).

Les techniques chromatographiques sont préférentiellement choisies car elles permettent la séparation des plastifiants en mélange. Par ailleurs, les différents couplages possibles avec les appareils de détection pour ces techniques chromatographiques offrent la

possibilité de développer des méthodes sensibles et spécifiques pour les besoins analytiques recherchés, c'est-à-dire selon la nature des analytes étudiés et selon les limites de quantification ciblées.

2.2.3. Modes de détection

En vue d'identifier et de quantifier les composés qui ont été séparés, la chromatographie est toujours associée à un détecteur. En pratique, pour l'analyse des plastifiants en mélange, la GC est couramment couplée avec le détecteur à ionisation de flamme et avec le spectromètre de masse (68,71,75,87,88,91,96,101,103,117,120,121,127,130,131,134). La LC est le plus souvent couplée soit au détecteur à barrette de diodes, soit au spectromètre de masse (88,89,96,104,106,111,119,135). Quant à la SFC, elle est principalement couplée avec le détecteur à barrette de diodes et le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (137–139). Dans ce paragraphe, l'ensemble de ces détecteurs vont être décrits.

2.2.3.1. Détecteur évaporatif à diffusion de lumière

Le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) mesure la déviation de la lumière produite par les analytes en sortie de colonne, à la suite d'une étape d'évaporation de la phase mobile. Pour l'analyse simultanée de plastifiants avec le détecteur DEDL, l'évaporation a été réalisée à une température comprise entre 30 et 40°C (138,139). Sur ce principe, le détecteur DEDL s'applique pour des nombreuses applications car il permet la détection d'une grande diversité chimique de composés. En effet, son application pour l'étude des plastifiants a montré qu'il est possible de détecter simultanément les composés avec un cycle aromatique et sans cycle aromatique, respectivement le DEHP, le DEHT, le TOTM et le BBP d'une part, et l'ATBC, le DEHA et le DINCH d'autre part (139). Ce mode de détection présente l'avantage d'être facile à utiliser et il peut être associé à une technique séparative rapide. Par exemple l'analyse de sept plastifiants a été obtenue en 7 minutes par couplage avec la SFC d'après l'étude menée par Vaccher *et al.* (2014) (139). La validation de méthodes analytiques par couplage de la chromatographie de partage avec le détecteur DEDL a permis d'atteindre des seuils de quantification de l'ordre du µg/ml pour les plastifiants (138). Ce mode de détection a notamment été appliqué pour l'étude de huit plastifiants (DEHP, DEHT, TOTM, BBP, DINP, ATBC, DEHA et DINCH) dans les dispositifs médicaux par couplage avec la LC et la SFC (138).

2.2.3.2. Détecteur à barrette de diodes

Le détecteur à barrette de diodes (DAD en anglais pour « diode-array detector ») mesure en sortie de colonne l'absorbance des échantillons. Il est possible d'enregistrer plusieurs longueurs d'onde de manière simultanée au cours d'une même analyse avec ce détecteur. Les substances colorées ont un pic d'absorption dans le domaine visible, tandis que les molécules avec un chromophore dans leur structure absorbent dans le domaine UV et visible. Pour l'analyse des plastifiants, la détection est majoritairement réalisée dans le domaine de l'UV car les plastifiants majoritairement étudiés sont composés d'un cycle benzénique. Elle permet la détection des plastifiants en mélange parmi lesquels le DEP, le DBP, le BBP, le DEHP et le DINP (88,96,104,111,135,137). Usuellement, les longueurs d'ondes appliquées pour la détection des plastifiants sont comprises entre 220 et 240 nm (67,88,96,104,111,137). Pour la quantification des plastifiants, ce mode de détection est souvent couplé à la LC pour une diversité de matrices comme par exemple les cosmétiques, les matrices aqueuses et les jouets en PVC pour l'analyse simultanée de sept, de huit et de dix plastifiants respectivement (88,96,104). Pour les matrices aqueuses, le couplage de la SFC avec le détecteur DAD a également été rapporté pour l'analyse des onze plastifiants (137). Le couplage de la chromatographie de partage avec le détecteur DAD permet le développement de méthodes très sensibles car cela permet d'atteindre des seuils de quantification pour l'analyse des plastifiants de quelques ng/ml tels que dans les cosmétiques et autres produits d'hygiène corporelle et dans les matrices aqueuses (67,88).

2.2.3.3. Détecteur à ionisation de flamme

Le détecteur à ionisation de flamme (FID) détecte en sortie de colonne le courant généré par les molécules carbonées qui ont été produites, à la suite de la combustion des molécules organiques par une flamme composée d'air et d'hydrogène. C'est un mode de détection qui est couramment utilisé en routine par couplage avec la GC. Le FID présente certains inconvénients comme par exemple le fait que c'est une méthode destructive et qu'elle n'est pas adaptée pour l'analyse des molécules non organiques. Toutefois, ce dernier point n'est pas limitant pour la détection des plastifiants car ce sont des molécules organiques. Le couplage de la GC avec le FID (GC-FID) a été rapporté pour l'analyse simultanée de mélange de plastifiants dans différentes matrices d'étude telles que les dispositifs médicaux en PVC (DEHP, DEHT, DINCH et TOTM) et dans les cosmétiques (DMP, DEP, DBP, BBP et DEHP) (93,140).

Ces trois modes de détection sont faciles à mettre en œuvre, peu onéreux, et de nombreux laboratoires en sont équipés. Ils ont fait leurs preuves pour la quantification des plastifiants dans diverses matrices car ils sont sensibles. Toutefois, un mode de détection supplante tous les autres pour l'analyse des plastifiants, il s'agit de la spectrométrie de masse (68,71,75,87–89,91,96,103,106,117,119–121,127,130,131,134). Il faut savoir que la GC-MS constitue la méthode de référence pour quantifier les plastifiants dans certaines matrices comme par exemple pour évaluer les jouets et produits pour enfants (ISO 8124-6), les textiles (NF EN ISO 14389), la qualité de l'eau (NF EN ISO 14389), et les vins et spiritueux (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) (141,142). Le couplage de la LC constitue une alternative pour l'analyse des plastifiants à l'état de mélange d'isomères et son couplage avec la MS/MS convient aux analyses à l'état d'ultra-traces.

2.2.3.4. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique de référence dans le domaine analytique. Son caractère universel s'explique entre autres par un couplage possible avec l'ensemble des systèmes chromatographiques, comme par exemple avec la GC, la LC et la SFC. De plus, c'est une technique d'analyse qui est à la fois qualitative et quantitative, et qui permet d'obtenir des informations d'ordre structurale sur les composés analysés. Le spectromètre de masse est composé de trois modules installés en série dans l'ordre suivant : la source d'ionisation, l'analyseur de masse et le détecteur. Ils sont tous soumis à un vide poussé afin de guider la trajectoire des analytes vers le détecteur.

- Les différentes sources d'ionisation

Dans la source d'ionisation, les analytes sont évaporés et ionisés. Il existe différents modes d'ionisation, ils se répartissent en deux catégories : l'ionisation dite « dure » et l'ionisation dite « douce ».

L'ionisation dite « dure » entraîne une fragmentation des analytes. La source d'ions à impact électronique (IE) est la source d'ionisation dure qui est la plus utilisée dans le cadre de la détection des plastifiants. Dans la source, les analytes entrent en collision avec un faisceau d'électrons d'énergie de 70 eV, ce qui entraîne la fragmentation des composés et leur ionisation (M^+). L'ionisation par IE est applicable aux molécules de faible masse moléculaire, volatiles et en phase gazeuse (143). Cela explique pourquoi cette source d'ionisation est principalement utilisée par couplage avec la GC.

Au contraire, l'ionisation dite « douce » n'entraîne pas, ou très peu, de fragmentation des analytes. L'ionisation par électronébulisation (ESI en anglais pour « electrospray ionization ») et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI en anglais pour « atmospheric pressure chemical ionization ») sont les deux sources d'ionisation dites « douces » les plus utilisées. Dans les deux cas, les analytes sont introduits dans la source à l'état liquide sous forme de gouttelettes, soit par un capillaire soumis à un champ électrique (par ESI), soit par un gaz (par APCI). Puis, le solvant des gouttelettes est évaporé en présence d'un gaz neutre (par ESI) ou par chauffage (par APCI), ce qui conduit à la formation des ions. Ces deux modes d'ionisation dites « douces » sont réalisés à pression atmosphérique. Ils sont utilisés par couplage avec la LC car elles s'appliquent aux molécules de faible masse moléculaire et en phase liquide (143).

- Les différents analyseurs de masse

L'analyseur de masse permet de séparer les ions produits dans la source en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Les analyseurs de masse les plus utilisés sont l'analyseur simple quadripôle (MS) et l'analyseur triple quadripôle (MS/MS) (Figure 33).

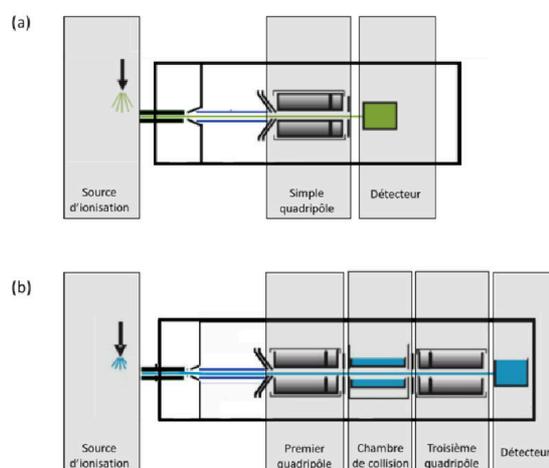


Figure 33 : Illustration des analyseurs de masse
(a) simple quadripôle, (b) triple quadripôle [adapté de www.agilent.com]

L'analyseur MS est composé de quatre électrodes générant un champ électrique oscillant permettant de guider la trajectoire des ions jusqu'au détecteur. L'analyse des ions par l'analyseur MS peut être réalisée soit en mode balayage (mode full scan) en considérant la totalité des ions formés, soit en mode single ion monitoring (mode SIM) par filtration de certains m/z spécifiques.

L'analyseur MS/MS fonctionne sur le même principe. À la différence de l'analyseur MS composé d'un seul compartiment, l'analyseur MS/MS est composé de trois compartiments en série : le premier quadripôle, une chambre de collision (deuxième quadripôle) et un troisième quadripôle. Cet analyseur permet de gagner en spécificité car il est possible de filtrer les ions au niveau de chaque quadripôle, ce qui permet d'obtenir un degré d'information supplémentaire sur la structure chimique des analytes. L'analyseur MS/MS a notamment été utilisé pour déterminer les plastifiants dans des échantillons de sols, de denrées alimentaires et de produits cosmétiques entre autres (67,91,106,119). Il présente l'avantage d'atteindre de très faibles seuils de quantification, de l'ordre de l'ultra-traces, car il est plus spécifique que l'analyseur MS et il est le plus souvent utilisé par couplage avec la LC.

Pour autant, l'usage de l'analyseur MS/MS est moins répandu pour l'analyse des plastifiants dans les matrices environnementales et les produits de consommation courante. Les freins à son utilisation sont d'une part le coût de l'appareil à l'achat qui est élevé et d'autre part les compétences techniques nécessaires pour la prise en main de l'appareil. C'est pourquoi, l'analyseur MS est davantage utilisé dans les laboratoires car bien qu'il soit onéreux et complexe à utiliser, il l'est moins que l'analyseur MS/MS. Un des inconvénients de l'analyseur MS est qu'il est moins résolutif que l'analyseur MS/MS car il ne permet pas de résoudre le cas des plastifiants sous forme de mélange d'isomères, comme le DINP pour lequel l'élution a lieu sous la forme d'un pic chromatographique mal résolu dit « multi-isomérique ». Néanmoins, la pratique expérimentale a montré qu'il est possible de quantifier de telles molécules en intégrant la somme des pics du composé (68,75).

2.2.4. Performances analytiques

Les méthodes d'analyse directe (RMN, FTIR) se prêtent bien à des analyses non ciblées. Elles fournissent des informations sur l'identité des molécules grâce à l'enregistrement de mesures électromagnétiques ou spectrales. Toutefois, leur principale limite réside dans le fait que ce sont des méthodes peu sensibles, restreignant leurs applications à la caractérisation des plastifiants majoritaires, voire à une caractérisation globale des teneurs totales en plastifiants (129,132,133). Aussi, ces techniques ont un caractère plus anecdotique quant à l'analyse des plastifiants, puisque leurs coûts associés sont bien trop élevés au regard des performances analytiques obtenues (129,144). Des analyses plus poussées sont obtenues avec les systèmes séparatifs, respectivement une technique séparative (GC, LC, SFC) et un mode de détection

(DAD, DEDL, FID, spectrométrie de masse). L'avantage de ces couplages est qu'ils permettent la séparation de composés en mélange avant leur détection. De plus, différents couplages avec les détecteurs sont possibles, ce qui offre une certaine adaptabilité de ces méthodes. En effet, cela permet de sélectionner le détecteur en fonction des objectifs analytiques visés. Le choix du mode de détection dépend donc des performances analytiques obtenues mais il doit aussi être compatible avec la nature des échantillons à analyser. Les seuils de détection et/ou de quantification obtenus avec les détecteurs DAD et FID sont de l'ordre du $\mu\text{g/ml}$ (67,101,104,111). Par comparaison, la spectrométrie de masse permet d'atteindre des seuils plus faibles, allant jusqu'au $\mu\text{g/l}$ en MS voire jusqu'au ng/l en MS/MS (120,145). Les performances obtenues en spectrométrie de masse sont rendues possibles grâce au soin apporté à la préparation des échantillons. C'est une étape capitale dans le sens où elle va impacter les seuils atteints par la méthode, autorisant l'analyse à l'état de traces voire à l'état d'ultra-traces (106,120). Cette étape est d'autant plus nécessaire que la spectrométrie de masse est bien plus sensible par rapport aux autres modes de détection. Ainsi, cela requiert de limiter les interférences issues de la matrice. Les concentrations mesurées à l'état d'ultra-traces ont été rapportées avec la mise en œuvre de techniques d'extraction variées telles que la technique QuEChERS, la SPME ou encore l'ASE (91,106,145). En dépit du frein lié au prix à l'achat, la détection par spectrométrie de masse est une technique présentant une grande spécificité et une grande sensibilité. Ces raisons suffisent à expliquer pourquoi elle s'est imposée comme une méthode d'analyse de choix, notamment pour le cas des plastifiants. En pratique, la MS est globalement privilégiée pour l'analyse des plastifiants par rapport à la MS/MS car cette dernière nécessite des compétences techniques plus poussées. Aussi, la MS présente l'avantage d'être disponible dans un grand nombre de laboratoires, c'est donc une technique qui est plus utilisée en pratique.

2.2.5. Sources de contamination externe et contrôles analytiques

En raison de l'omniprésence des plastifiants, les sources potentielles de contamination lors de leur analyse sont multiples et incluent les solvants organiques, les consommables (bouchon en plastique) et les équipements (évaporation par air comprimé et systèmes chromatographiques). À titre d'exemple, le DEHP, le DBP et le DIBP font partie des contaminants qui ont été caractérisés au cours de la procédure analytique (45,89,106). Ainsi, il est nécessaire de vérifier l'absence de contamination en mettant en place des contrôles analytiques. Dans le but de limiter les incertitudes de la mesure liées aux contributions externes,

plusieurs précautions doivent être prises. En premier lieu, il est nécessaire de limiter au maximum le recours aux consommables en plastique quand cela est possible et de privilégier les matériaux en verre, comme les tubes à hémolyse par exemple (89). D'autre part, lors d'utilisation de verrerie réutilisable, des procédures de nettoyage par rinçage avec des solvants organiques, tels que le tétrahydrofurane, l'éthanol, le dichlorométhane ou encore l'hexane, sont à préconiser et peuvent être associées ou non à une étape de calcination qui consiste à dégrader les plastifiants par chauffage à haute température (400-450°C) (68,71,75,89,96,119). En outre, les solvants organiques de haute pureté (qualité HPLC) doivent être préférentiellement choisis. Enfin, lors du recours aux consommables en plastique, comme les pointes de pipette par exemple, il convient de vérifier au préalable l'absence de contamination avant de les utiliser. L'absence de contamination par l'application de l'ensemble de ces mesures peut être évaluée par l'injection d'un blanc méthode, qui correspond à un échantillon sans matrice ayant subi à l'identique toutes les étapes de la procédure extractive jusqu'à son injection. En parallèle, des blancs instrumentaux doivent également être inclus durant le processus analytique pour s'assurer de l'absence de contaminations croisées. Pour cela, le solvant seul est injecté au début de chaque série d'injections et entre les répliqués d'injection. D'autres sources de contamination ont également été caractérisées à l'échelle instrumentale en LC, liées par exemple aux tubulures (146). Pour s'affranchir de cette contribution, une colonne de piégeage peut être installée entre la chambre de mélange des solvants de la phase mobile et l'injecteur pour retarder l'élution des pics interférents par rapport aux analytes de l'échantillon (106). L'application de ces mesures doit être de rigueur lors des analyses pour caractériser les plastifiants dans diverses matrices afin de renforcer le degré de confiance des mesures obtenues.

Le tableau IV fait la synthèse des principales techniques analytiques mises en œuvre dans le cadre de l'étude des plastifiants.

Tableau IV : Méthodes analytiques utilisées pour les plastifiants

Échantillon	Plastifiants	Extraction	Volume injecté	Séparation et détection	Phase stationnaire (dimensions)	Phase mobile (mode d'élution)	LOQ	Référence
Matrices aqueuses	n=4 (PAE)	DLLME	20 µl	HPLC-DAD (225 nm)	C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 10 µm)	Acétonitrile/eau (isocratique)	de 0,43 à 1,27 µg/ml	Ranjbari et Hadjmohammadi, 2012 (111)
Boissons	n=7 (PAE)	SPE vs DLLME	1 µl	GC-FID	SE-54 5% phenyl - 95% dimethylpolysiloxane (30 m x 250 µm i.d., 0,25 µm)	Hydrogène (gradient)	de 1,2 à 8,2 µg/ml	Notardonato <i>et al.</i> , 2021 (101)
Dispositifs médicaux en PVC	n=19 (PAE + non PAE)	Extraction liquide classique	1 µl	GC-MS (Scan/SIM)	HP-5MS (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm)	Hélium (gradient)	de 0,25 à 2,5 µg/ml	Gimeno <i>et al.</i> , 2014 (75)
Matériaux en polymère	n=7 (PAE)	Désorption thermique	ND	GC-MS (Scan/SIM)	Colonne UA-PBDE (15 m x 0,25 mm i.d., 0,05 µm)	Hélium (gradient)	ND	Kim <i>et al.</i> , 2016 (117)
Boissons	n=12 (PAE + non PAE)	QuEChERS	2 µl	GC-MS/MS (MRM)	HP-5ms (15 m x 0,25mm i.d., 0,25 µm)	Hélium (gradient)	de 0,034 à 1,415 µg/l	Rodriguez-Ramos <i>et al.</i> , 2020 (91)
Sols	n=24 (PAE + MAE)	ASE vs PLE	3 µl	LC-MS/MS (ESI+/-, MRM)	ACQUITY BEH Phenyl (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm)	Acétonitrile/eau (gradient)	ND	Hu <i>et al.</i> , 2020 (106)
Poissons	n=5 (PAE)	SPME	20 µl	LC-MS/MS (ESI+, MRM)	aQ C18 (100 mm x 2,1 mm i.d., 2,6 µm)	Méthanol/eau (gradient)	ND	Panio <i>et al.</i> , 2020 (119)
Matrices aqueuses	n=15 (PAE)	SPME	1 µl	GC-MS (SIM)	DB-5 MS (30 m x 250 µm, i.d., 0,25 µm)	Hélium (gradient)	ND	Zhang <i>et al.</i> , 2014 (120)
Eaux en bouteille	n=6 (PAE)	LLE	1 µl	GC-MS (Scan/SIM)	SPB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	Helium (gradient)	ND	Zaater <i>et al.</i> , 2014 (88)
				HPLC-DAD (235 nm)	ODS2 C8 (250 mm x 0,46 mm, 5 µm)	Acétonitrile/eau (gradient)	ND	
Cosmétiques	n=3 (PAE)	Extraction liquide classique + ultrasons	1 µl	GC-MS (Scan/SIM)	HP-5MS UI (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	Helium (gradient)	de 0,0015 µg/ml à 0,0021 µg/ml	Kim <i>et al.</i> , 2020 (103)

Échantillon	Plastifiants	Extraction	Volume injecté	Séparation et détection	Phase stationnaire (dimensions)	Phase mobile (mode d'élution)	LOQ	Référence
Cosmétiques	n=11 (PAE + non PAE)	Extraction liquide classique + ultrasons + purification (SPE)	ND	GC-MS (Scan/SIM)	HP 5MS (30 m x 0,25 mm id, 0,25 µm)	Hélium (gradient)	ND	Shen <i>et al.</i> , 2007 (96)
				HPLC-DAD (230 nm)	Zorbax C8 (150 mm x 4,6 mm, 3 µm)	Méthanol/eau (gradient)	ND	
Jouets en PVC	n=10 (PAE)	Extraction liquide classique + ultrasons	20 µl	HPLC-DAD (226 nm)	Inertsil ODS-4 C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm)	Acétonitrile/eau (gradient)	de 0,04 à 0,30 mg/l	Akkbik <i>et al.</i> , 2020 (104)
Dispositifs médicaux en PVC	n=7 (PAE)	Extraction liquide classique	1 µl	GC-MS (Scan/SIM)	Optima 5 Accent (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	Hélium (gradient)	de 0,1 à 1,5 µg/ml	Bourdeaux <i>et al.</i> , 2016 (68)
Boissons en bouteille	n= 11 (PAE)	SBSE	5 µl	SFC-DAD(225 nm)	Ultimate XB-C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm)	CO ₂ /méthanol (ND)	de 0,005 à 0,010 µg/ml	Lou <i>et al.</i> , 2018 (137)
Produits d'hygiène corporelle et cosmétiques	n=6 (PAE)	DLLME	20 µl	HPLC-DAD (225 nm)	ODS reverse phase (15 cm x 0,40 cm x 5 µm)	ACN/10 mM acétate d'ammonium (gradient)	ND	Viñas <i>et al.</i> , 2015 (67)
				HPLC-IT-MS/MS (ESI, MRM)			ND	
Eaux en bouteille	n=9 (PAE)	HSSE	ND	GC-MS (Scan/SIM)	DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	Hélium (gradient)	ND	Cao <i>et al.</i> , 2008 (121)

ND : non déterminé

PAE : phtalates

Non PAE : non phtalates

MAE : métabolites des phtalates

CHAPITRE 3 – CONSÉQUENCES SANITAIRES DES EXPOSITIONS AUX PLASTIFIANTS

Le contexte de multi-exposition aux plastifiants souligne le fait que la population est exposée par différentes voies. Les concentrations quantifiées dans les fluides biologiques ont permis d’apprécier les niveaux d’imprégnation des populations, principalement à partir d’échantillons urinaires et sanguins (147,148). Par exemple, au moins un phtalate a été quantifié sur l’ensemble des échantillons urinaires analysés dans le cadre de l’étude de biosurveillance Esteban (population française, entre 2014 et 2016) (149). Cela amène à s’interroger quant au devenir des plastifiants dans l’organisme, et notamment de leurs effets sur la santé humaine. Ainsi, dans ce chapitre, le devenir des plastifiants dans l’organisme va être abordé. Puis, les données de toxicité des plastifiants et le contexte de restrictions concernant l’usage des plastifiants qui en résulte seront successivement décrits.

1. Données pharmacocinétiques

Les données abordées dans le chapitre sur le contexte de multi-exposition montrent que l’absorption des plastifiants peut survenir par différentes voies d’exposition. À la suite de leur absorption (sauf par voie parentérale), les plastifiants vont se distribuer dans l’organisme, être métabolisés puis éliminés. La figure 34 illustre les différentes phases pharmacocinétiques pour les plastifiants.

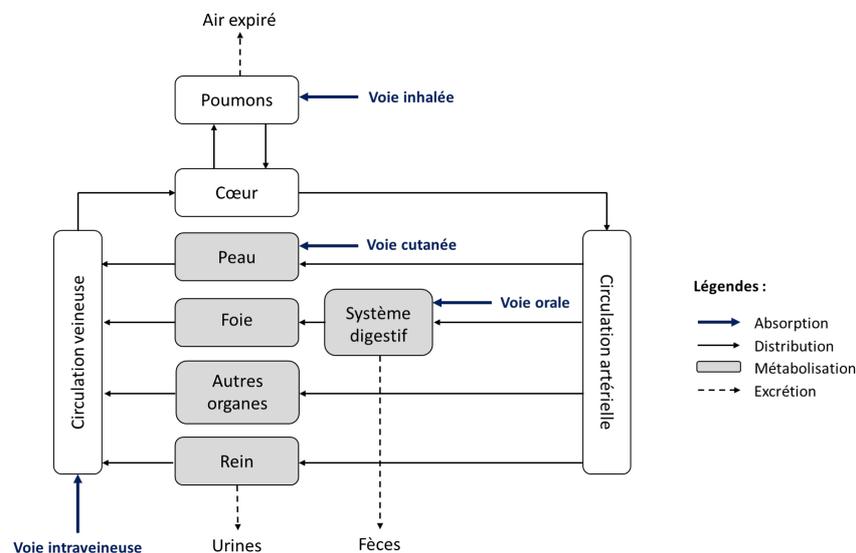


Figure 34 : Schéma illustrant les étapes pharmacocinétiques pour les plastifiants [adapté de Tan *et al.* (2007) (150)]

Ces différentes phases (absorption, distribution, métabolisation et élimination) vont être décrites dans ce paragraphe en se basant sur les études pharmacocinétiques disponibles dans la littérature.

1.1. Phase d'absorption

La phase d'absorption correspond au passage des substances vers la circulation systémique. Les plastifiants peuvent entrer dans l'organisme par voies orale, inhalée, cutanée et parentérale. Le tableau V fait une synthèse des estimations des données d'absorption pour plusieurs plastifiants d'intérêt pour ces voies d'exposition chez l'Homme, en se basant sur les dossiers d'évaluation des risques disponibles.

Tableau V : Estimation des pourcentages d'absorption de plastifiants pour les différentes voies d'exposition

Composés	Estimation de l'absorption chez l'Homme (en %)				Références
	Parentérale	Orale	Inhalée	Cutanée	
DMP	100	100	100	10	NICNAS 2014(151)
DEP	100	100	ND	10	NICNAS 2011 (152)
DIBP	100	100	ND	10	EPA 2015 (153)
DBP	100	100	100	5	NICNAS 2013(154)
DEHP	100	100	ND	[2,5-5]	EPA 201 ; NICNAS 2010 ; SCENIHR 2016 ; NICNAS 2015 (153,155–157)
DINP	100	100	[75-100]	≤ 4	SCENIHR 2016 ; NICNAS 2012 (156,158)

ND : non disponible

Il faut noter que les dossiers d'évaluation des risques des plastifiants ont été rédigés antérieurement aux études évaluant la bioaccessibilité. C'est pourquoi, une valeur de 100% a été fixée par défaut pour les voies orale et inhalée en raison de l'absence de données humaines disponibles dans la littérature (Tableau V). L'absorption dépend des pratiques des individus (durée et fréquence d'exposition, environnements fréquentés). Elle est aussi fonction des propriétés physico-chimiques des plastifiants et de la voie d'exposition ; ces facteurs vont être abordés plus en détail.

1.1.1. Paramètres liés aux propriétés physico-chimiques des plastifiants

L'absorption des plastifiants dépend en partie de leurs propriétés physico-chimiques. Elle est régie par la fraction pouvant être effectivement absorbée, il s'agit de la fraction biodisponible. Elle peut être évaluée expérimentalement par des méthodes acellulaires qui permettent de déterminer la bioaccessibilité, correspondant à la fraction qui est libérée dans les fluides biologiques (159). Elle dépend du coefficient de partage des plastifiants et de leur taille (85,160–162). Ces paramètres vont être évoqués dans le sous-paragraphe suivant pour illustrer les paramètres liés à la voie d'exposition.

1.1.2. Paramètres liés à la voie d'exposition

La voie d'exposition influence l'absorption des plastifiants. En effet, les plastifiants doivent franchir différentes barrières biologiques lors des expositions par voie orale, inhalée et cutanée. En revanche, cela ne concerne pas la voie parentérale pour laquelle l'absorption est totale car les substances atteignent directement la circulation systémique du fait du mode d'administration.

- Par voie orale, l'absorption des plastifiants a lieu au niveau de la barrière gastro-intestinale. L'absorption par voie orale des plastifiants est d'autant plus importante qu'ils sont relativement peu hydrophobes et que la longueur de leurs chaînes alkyles est courte (159,163). Expérimentalement, le degré d'absorption des plastifiants par voie orale peut être évalué en mesurant la fraction de la dose excrétée dans les urines (somme des métabolites) à la suite de l'administration d'un isotope deutéré du composé considéré (DBP-d4, DIBP-d4 et DINP-d4) (164,165). En effet, la voie urinaire est la principale voie d'excrétion qui a été décrite pour les plastifiants (cf Chapitre 3, §1.4. Phase d'élimination). Le tableau VI détaille les données d'absorption par voie orale chez l'Homme pour ces trois plastifiants.

Tableau VI : Pourcentages urinaires de la dose administrée par voie orale

Plastifiant	Dose administrée	Métabolites	Fraction urinaire de la dose, 48h après l'administration (en %)	Référence
DBP-d4	60 µg/kg	MBP	84,2	Koch et al., 2012 (165)
		3OH-MBP	6,93	
		4OH-MBP	0,70	
		2OH-MBP	0,17	
		M CPP	0,50	
		3oxo-MBP	ND	
		Σmétabolites	92,5	
DIBP-d4	60 µg/kg	MIBP	70,7	Koch et al., 2012 (165)
		2OH-MIBP	19,5	
		3OH-MIBP	0,70	
		Σmétabolites	90,8	
DINP-d4	1270 µg/kg	MINP	2,2	Koch et Angerer, 2007 (164)
		OH-MINP	20,2	
		cx-MINP	10,7	
		oxo-MINP	10,6	
		Σmétabolites	43,6	

ND : non détecté, MBP : phtalate de monobutyle, 3OH-MBP : 3OH-mono-n-butylphtalate, 4-OH-MBP : 4OH-mono-n-butylphtalate, 2OH-MBP : 2OH-mono-n-butylphtalate, MCPP : mono(3-carboxy-propyl)phtalate, 3oxo-MBP : mono-3-oxo-n-butyl phtalate, MIBP : phtalate de mono-iso-butyle, 2OH-MIBP : 2OH-mono-iso-butylphtalate, 3OH-MIBP : 3OH-mono-iso-butylphtalate, MINP : phtalate de mono-isononyl, OH-MINP : mono-hydroxy-isononyl phtalate, cx-MINP : mono-carboxy-isononyl phtalate, oxo-MINP : mono-oxo-isononyl phtalate.

La lipophilie et la taille des plastifiants sont deux facteurs qui influencent la bioaccessibilité par voie orale des plastifiants, comme cela a été évoqué *in vitro* par reconstitution expérimentale de fluides digestifs en étudiant différents plastifiants à partir de poussières (166). Les résultats

de cette étude rapportent une fraction bioaccessible plus importante pour le DMP (81,1%) comparativement au DEHP (1,21%) par exemple.

- Par voie inhalée, l'absorption des plastifiants a lieu dans le système respiratoire inférieur, au niveau de la barrière alvéolo-capillaire. La pénétration des plastifiants dans le système respiratoire diffère selon que les plastifiants soient en phase gazeuse ou adsorbés sur les particules. Pour ces dernières, le dépôt des plastifiants est inversement corrélé à leur taille (159,162). Une fois dans la zone alvéolaire, le passage de la barrière alvéolo-capillaire va dépendre de la fraction bioaccessible pulmonaire des plastifiants, qui est elle-même fonction de la lipophilie des plastifiants et de leur taille (159,160). L'influence de ces paramètres a été montrée expérimentalement dans le cadre d'une étude visant à évaluer *in vitro* la bioaccessibilité pulmonaire de plastifiants à partir de poussières, à l'aide de fluides pulmonaires artificiels. Par exemple, la bioaccessibilité du DMP et du DEP (< 75%) est bien supérieure à celle du DEHP, du DEHT et du DINCH (< 5% chacun) (160). Toutefois, la bioaccessibilité pulmonaire serait plus complexe. La nature de la phase est un facteur supplémentaire à prendre en compte pour évaluer la bioaccessibilité. Cela a été rapporté par une autre étude menée chez l'Homme pour le DEP-d4 (phase gazeuse) et le DEHP-d4 (phase particulaire). Les résultats sont représentés dans le Tableau VII et sont exprimés en pourcentages urinaires de la dose administrée par voie inhalée (162).

Tableau VII : Pourcentages urinaires de la dose administrée par voie inhalée

Plastifiant	Dose administrée	Métabolites	Fraction urinaire de la dose, 24h après l'administration (en %) (a)	Référence
DEP-d4 (phase gazeuse)	300 µg/m ³	MEP Σmétabolite	99,5 99,5	Krais <i>et al.</i> , 2018 (162)
DEHP-d4 (phase particulaire)	100 µg/m ³	MEHP 5OH-MEHP 5oxo-MEHP 5cx-MEPP 2cx-MMHP Σmétabolites	ND ND ND ND ND 94,0	Krais <i>et al.</i> , 2018 (162)

ND : non détaillée, (a) : la fraction urinaire de la dose a été calculée avec une fraction déposée dans l'appareil respiratoire de 100% pour le DEP-d4 et 26% pour le DEHP-d4, MEP : phalate de monoéthyle, MEHP : phtalate de mono-(2-éthylhexyle), 5OH-MEHP : mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phtalate, 5oxo-MEHP : mono-(2-ethyl-5-oxohexyl)phtalate, 5cx-MEPP : mono-(2-ethyl-5-carboxypentyl)phtalate, 2cx-MMHP : mono-[2-(carboxyméthyl), hexyl]phtalate.

- Par voie cutanée, l'absorption des plastifiants nécessite le passage de la barrière cutanée. La pénétration des plastifiants à travers la peau est fonction de leur lipophilie. En effet, ils doivent traverser l'épiderme, qui est composé de lipides (céramides, cholestérol et acides gras libres) (167). Par exemple, il a été observé expérimentalement que le passage des plastifiants les plus

lipophiles (DEHP, DEHT) est favorisé, d’après une étude menée chez l’Homme à partir de lingettes (168). La capacité de diffusion à travers la barrière cutanée est aussi fonction de la nature des chaînes alkyles des plastifiants. En effet, la fraction excrétée (urines et fèces) de la dose administrée par voie cutanée chez le rongeur a été mesurée comme étant plus importante pour le DEP (25%), tandis qu’une diminution a été observée pour les plastifiants avec des chaînes alkyles plus longues et/ou ramifiées (169). Mais le DMP fait figure d’exception car sa fraction excrétée a été mesurée comme étant plus faible que le DEP, à hauteur de 6%, alors qu’il est composé d’un atome de carbone en moins sur chacune de ses chaînes alkyles (169). Les fractions urinaires mesurées chez l’Homme à la suite d’une administration cutanée ont été rapportées pour le DEP et le DBP, elles sont détaillées dans le tableau VIII (170).

Tableau VIII : Pourcentages urinaires de la dose administrée par voie cutanée

Plastifiant	Dose administrée	Métabolites	Fraction urinaire journalière moyenne de la dose administrée (en %)	Référence
DEP	2% (m/m)	MEP	5,8	Janjua <i>et al.</i> , 2008 (170)
DBP	2% (m/m)	MBP	1,8	Janjua <i>et al.</i> , 2008 (170)

MEP : phtalate de monoéthyle, MBP : phtalate de monobutyle.

Le sébum et la sueur sont deux facteurs à prendre en compte car ils influencent la bioaccessibilité cutanée, comme cela a été rapporté par une étude menée chez l’Homme à partir de poussières intérieures et de vêtements (85). Dans cette étude, la fraction bioaccessible a été mesurée comme étant généralement supérieure dans un mélange de sueur et de sébum (30% et 70% respectivement) comparativement à la sueur et au sébum testés séparément pour divers plastifiants (DEP, DBP, DEHP, ATBC et DEHT). À titre d’exemple, la fraction bioaccessible cutanée du DBP à partir de poussières dans la sueur, le sébum, et dans le mélange de sueur et de sébum est respectivement de 57,0%, de 55,0% et de 81,7% (85). Par ailleurs, le passage cutané peut être modifié par des changements cutanés (lésions et occlusion). Les lésions cutanées correspondent à une altération de l’intégrité de la barrière cutanée, ce qui explique pourquoi le passage peut être favorisé. De même, le passage est favorisé lors d’une occlusion de la peau. Cette occlusion est observée par exemple avec le port de gants. Lors d’une occlusion cutanée, il y a une augmentation de l’hydratation de la peau par sudation, et cela concourt à augmenter la perméabilité de la barrière cutanée (171).

De plus, les plastifiants doivent franchir les couches hydrophiles de la peau. En effet, les molécules parents se localisent au niveau de la couche cornée de l’épiderme (lipophile), ce qui limite leur diffusion (172). Pour pouvoir traverser les couches sous-jacentes (couches

hydrophiles de l'épiderme et derme), les plastifiants doivent être métabolisés. Ce métabolisme cutané sera abordé dans la partie concernant la métabolisation (cf Chapitre 3, §1.3.1. Métabolisation cutanée).

En somme, les résultats des études pour la voie cutanée soulignent la complexité de l'absorption des plastifiants. L'ensemble des facteurs évoqués pourraient expliquer pourquoi l'absorption des plastifiants par voie cutanée a été rapportée comme étant faible chez l'Homme, par rapport aux autres voies d'exposition.

Une fois absorbés, les plastifiants atteignent la circulation sanguine. En effet, plusieurs études ont relevé des concentrations circulantes (sang total, plasma) en plastifiants chez l'Homme (147,148). Dans ces revues de la littérature, il a été rapporté dans ces matrices des concentrations en plastifiants de l'ordre du ng/ml (allant de quelques ng/ml jusqu'à 85,1 ng/ml), et ce à tous les âges de la vie et dans toutes les régions du monde (Afrique, Amérique, Asie et Europe). La demi-vie des plastifiants dans le compartiment vasculaire a été rapportée expérimentalement comme étant inférieure à 24 heures (159). En pharmacocinétique, la demi-vie correspond au temps au bout duquel la concentration d'une substance diminue de moitié dans l'organisme. Par voie intraveineuse, les demi-vies ont par exemple été déterminées entre 0,1 et 6,1 heures (Tableau IX) (159). En effet, après avoir atteint le compartiment vasculaire, les plastifiants se répartissent dans l'organisme.

1.2. Phase de distribution

La phase de distribution correspond à l'étape durant laquelle les composés se répartissent dans les différents organes et tissus de l'organisme. Les données relatives à la distribution des plastifiants dans l'organisme sont issues des études réalisées chez les rongeurs. Il faut noter que pour ces études les données sont inégales entre les plastifiants. Par exemple, les données de distribution ont été décrites pour le DEHP, le DEHT et le DINP (173–176). Au contraire, les données sont manquantes pour d'autres plastifiants, tels que le DPP et le DphP. Les plastifiants ne ciblent pas un organe/tissu en particulier. Ils peuvent se distribuer au niveau du foie, du cœur, des reins ou encore du tissu adipeux (151,152,154,155,157,177–183). De plus, la distribution des plastifiants a été caractérisée sans accumulation car leur demi-vie biologique est généralement estimée entre 8 et 48 heures (184). Cependant, le tissu adipeux fait figure d'exception car les demi-vies mesurées sont relativement longues comme cela a été rapporté pour le DEHP et le MEHP chez le rat (Tableau X) (173). Il est intéressant de noter que la

distribution est fonction de la voie d'exposition : allant jusqu'à 76,16% pour le foie par voie intraveineuse (DEHP), allant jusqu'à 5,93% pour le tissu adipeux par voie orale (DEHP) et n'excédant pas 1% dans les organes par voie cutanée (DINP) (176,185). Il a été montré que les plastifiants se concentrent majoritairement dans la peau à la suite d'une application topique (169,172,186). À titre d'exemple, 45% de la dose administrée a été localisée au niveau de la peau pour le BBP (179). Pour autant, une absorption différée par voie cutanée est possible. Par exemple, la concentration maximale urinaire chez l'Homme a été mesurée plus tardivement à la suite de l'administration de l'adipate de dibutyle (DnBA), un plastifiant de substitution du DBP, par voie cutanée (à t=5 heures, 72 µg/g créatinine) par rapport à la voie orale (à t=1,5 heure, 39,9 µg/g créatinine) (187).

1.3. Phase de métabolisation

La phase de métabolisation correspond à des modifications chimiques des composés. Son but est de diminuer leur lipophilie en les rendant hydrophiles et polaires par réactions d'oxydation et de conjugaison, respectivement par des enzymes de phase I et de phase II. Parmi les enzymes de phase I, il y a les estérases et les cytochromes P450. Les enzymes de phase II regroupent les transférases.

Les plastifiants peuvent être métabolisés par différents organes tels que la peau et le foie. La finalité de la métabolisation n'est pas la même entre ces organes. Pour la peau, la phase de biotransformation détermine l'absorption des composés lipophiles, pour qu'ils puissent pénétrer à travers la couche hydrophile de l'épiderme et le derme afin d'atteindre la circulation sanguine. La métabolisation hépatique permet quant à elle l'élimination des composés lipophiles de l'organisme. L'activité métabolique de ces deux organes va être présentée successivement.

Tableau IX : Exemples de demi-vies dans le compartiment sanguin à la suite d'une administration par voie intraveineuse
[In Domínguez-Romero et Scheringer (2019) (159)]

Composé administré	Voie d'exposition	Espèce étudiée	Dose(s) (administration)	Matrice	Composé mesuré	Demi-vie (en heures)	Source
[¹⁴ C]-BBP	Intraveineuse	Rat	20 mg/kg (unique)	Sang	BBP	0,2	Eigenberg <i>et al.</i> , 1986
[¹⁴ C]-DBP	Intraveineuse	Rat	1 ou 10 mg/kg (unique)	Plasma	DBP	0,1	Payan <i>et al.</i> , 2001
[¹⁴ C]-DEHP	Intraveineuse	Rat	200 mg/kg (unique)	Sang	Dérivés radioactifs	0,4	Schulz et Rubin, 1973
DINP	Intraveineuse	Rat	10 mg/kg (unique)	Plasma	DINP	6,1	Hou <i>et al.</i> , 2013

Tableau X : Demi-vies tissulaires du DEHP et du MEHP à la suite d'une administration par voie orale

Composé administré	Voie d'exposition	Espèce étudiée	Dose (administration)	Matrice	Demi-vie		Source
					DEHP	MEHP	
DEHP	Orale	Rat	9764 mg/kg (unique)	Cœur	15,2 h	28,8 h	Oishi et Hiraga, 1982 (173)
				Poumons	25,3 h	/	
				Foie	28,4 h	31,9 h	
				Rate	/	22,6 h	
				Testicules	8,28 h	49,9 h	
				Tissu adipeux (épididyme)	156 h	67,6 h	

/ : non décrit

1.3.1. Métabolisation cutanée

L'absorption par voie cutanée des plastifiants est régie par leur métabolisation. À la suite du franchissement de la couche cornée de l'épiderme qui est lipophile, les plastifiants doivent franchir les couches hydrophiles de l'épiderme et du derme pour atteindre la circulation sanguine. Ainsi, une étape de biotransformation des plastifiants est nécessaire et vise à les rendre plus hydrophiles. C'est au niveau de la couche cornée de l'épiderme qu'est localisée l'activité métabolique cutanée (167). L'étape de biotransformation cutanée des plastifiants implique l'activité des estérases qui catalyse la réaction d'hydrolyse des groupements esters, comme cela a été rapporté par une étude menée sur des explants de peau humaine (sur des cellules de diffusion de Franz) pour le DBP, le BBP et le DEHP (188). Le rôle prédominant de la carboxylestérase a notamment été mis en évidence lors d'une étude visant à évaluer le rôle de l'activité enzymatique cutanée *ex vivo* sur l'absorption du DBP (172). Les résultats de ces études mettent en exergue le rôle de la métabolisation au niveau de l'épiderme puisque le composé parent administré et son métabolite monoester produit (moins lipophile), ont été localisés à deux endroits distincts de la peau, respectivement dans l'épiderme et dans le derme (172,188). La métabolisation semble donc constituer une étape limitante pour la diffusion des plastifiants à travers la peau, et donc pour leur biodisponibilité. La biodisponibilité correspond à la fraction atteignant le compartiment sanguin.

Concernant le passage des plastifiants à travers la barrière cutanée, certaines études ont apporté des informations concernant la fraction localisée dans la peau et celle ayant traversée la peau, ces fractions sont exprimées en pourcentage de la dose administrée (189–191). Elles ont été réalisées sur des peaux animales (*in vivo* ou *ex vivo*) et humaines (*ex vivo*). Les résultats de ces études sont décrits dans l'annexe I. Il faut noter que seuls les composés parents radiomarqués ont été recherchés au cours de ces études, ce qui ne permet pas de comparer en parallèle la répartition des métabolites. À ce jour, tous les plastifiants n'ont pas été documentés, ce qui restreint les données à un faible nombre de plastifiants.

Il faut savoir que la capacité de métabolisation de la peau est relativement faible comparativement à celle du foie. En effet, la capacité d'hydrolyse mesurée *ex vivo* au niveau de la peau ne représente que 1,5% de celle hépatique (151). La métabolisation hépatique va être abordée dans le sous-paragraphe suivant.

1.3.2. Métabolisation hépatique

Le foie est le principal organe où a lieu le métabolisme des xénobiotiques, dont celui des plastifiants. Dans le foie, les phtalates sont majoritairement présents sous forme monoester car ils ont été hydrolysés en amont par les estérases tissulaires, comme par exemple les carboxylestérases de l'épiderme (voie cutanée) et les lipases pancréatiques (voie orale). La faible proportion du composé parent, ayant atteint la circulation sanguine, peut être hydrolysée ultérieurement en monoester par les estérases du sang et du foie. Il faut savoir qu'un même plastifiant peut conduire à la formation de différents métabolites monoesters régiosélectifs. C'est par exemple le cas du DINP, composé d'un mélange d'isomères principalement en C9 mais qui se compose aussi d'isomères en C8 et en C10. Il en va de même pour les plastifiants composés de plus de deux chaînes alkyles, entraînant la formation possible de différents monoesters régiosélectifs comme par exemple pour les plastifiants non phtalates tel que le TOTM. La formation des métabolites régiosélectifs est illustrée en figure 35 pour le cas du TOTM (192).

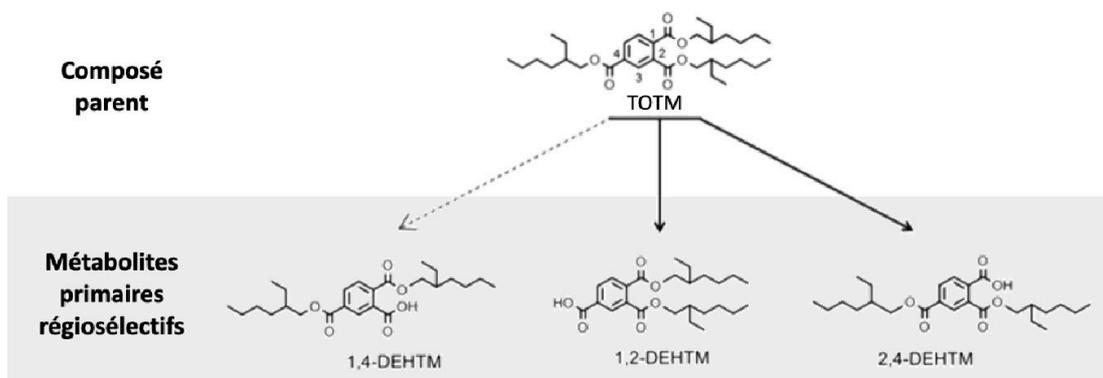


Figure 35 : Formation des métabolites régiosélectifs du TOTM (réactions de phase I)
[In Hollerer *et al.*, 2018 (192)]

TOTM : trimellitate de trioctyle, 1,4-DEHTM : 1,4-di-(2-ethylhexyl) trimellitate, 1,2-DEHTM : 1,2-di-(2-ethylhexyl) trimellitate, 2,4-DEHTM : 2,4-di-(2-ethylhexyl) trimellitate.

Une fois sous forme monoester, la métabolisation des phtalates se déroule en deux temps, avec une phase de fonctionnalisation (réactions de phase I) suivie d'une phase de conjugaison (réactions de phase II). Il faut savoir que les plastifiants empruntent des voies de métabolisation communes, bien qu'ils aient des structures chimiques différentes, tels que les phtalates, les téréphtalates et les trimellitates. En effet, ils ont pour point commun d'être composés de groupements esters et de chaînes alkyles, et c'est à ce niveau que sont initiées les réactions de métabolisation. Ainsi, les propos abordés ici concernant la métabolisation des phtalates sont

généralisables aux autres familles de plastifiants, notamment les téréphtalates et les trimellitates. Le schéma général de métabolisation des phtalates est présenté en figure 36.

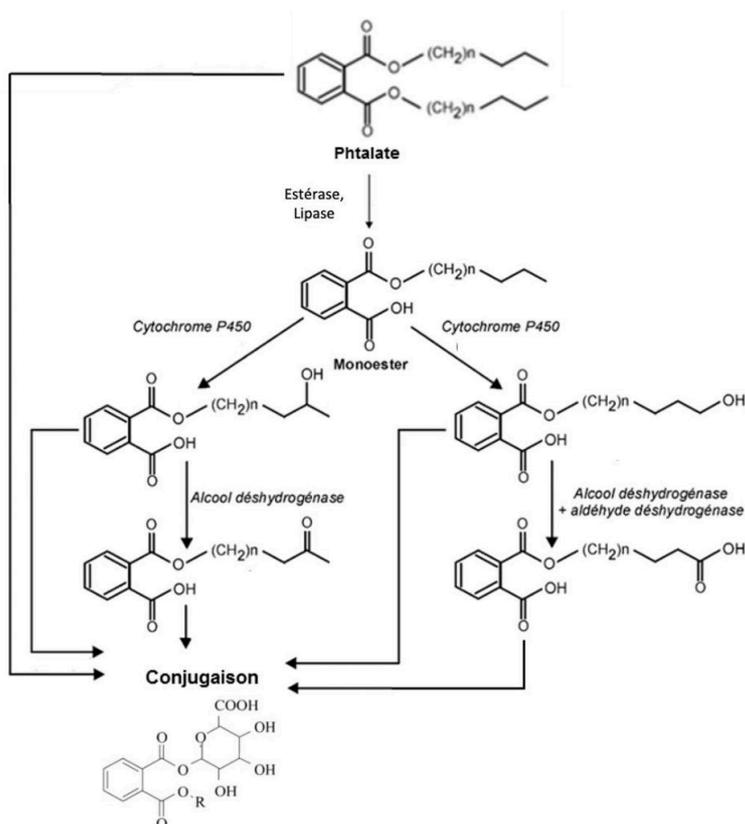


Figure 36 : Schéma général de métabolisation des plastifiants (cas des phtalates)
 [adapté de INSERM (2011) (193)]

Le schéma de métabolisation des plastifiants est fonction de leurs propriétés physico-chimiques. En effet, les plastifiants sous forme monoester peuvent faire ou non l'objet de réactions d'oxydation (194). Par exemple, les monoesters des phtalates de bas poids moléculaires tel que le monoester de diéthyle (MEP) ne sont pas oxydés car ils sont relativement hydrophiles comparativement aux monoesters des phtalates de haut poids moléculaire, tel que le DEHP (49). Pour les phtalates de haut poids moléculaire (lipophiles), des réactions d'oxydation ultérieures sont nécessaires pour former des métabolites moins lipophiles, il s'agit de métabolites secondaires. Les métabolites secondaires formés regroupent les dérivés hydroxylés formés par les cytochromes P450 et pouvant être transformés en dérivés cétoniques et carboxylés ultérieurement par les alcools déshydrogénases et les aldéhydes déshydrogénases (193). Par ailleurs, il faut souligner que le degré de ramification des chaînes alkyles des phtalates conduit à la formation d'un plus grand nombre de métabolites secondaires, comme par exemple pour le DEHP (Figure 37) (194). Cela vaut aussi pour les phtalates composés de

mélange d'isomères tel que le DINP et pour les plastifiants non phtalates composés de plus de deux chaînes alkyles tel que le TOTM, pour les mêmes raisons évoquées précédemment concernant la formation des métabolites monoesters (164,192).

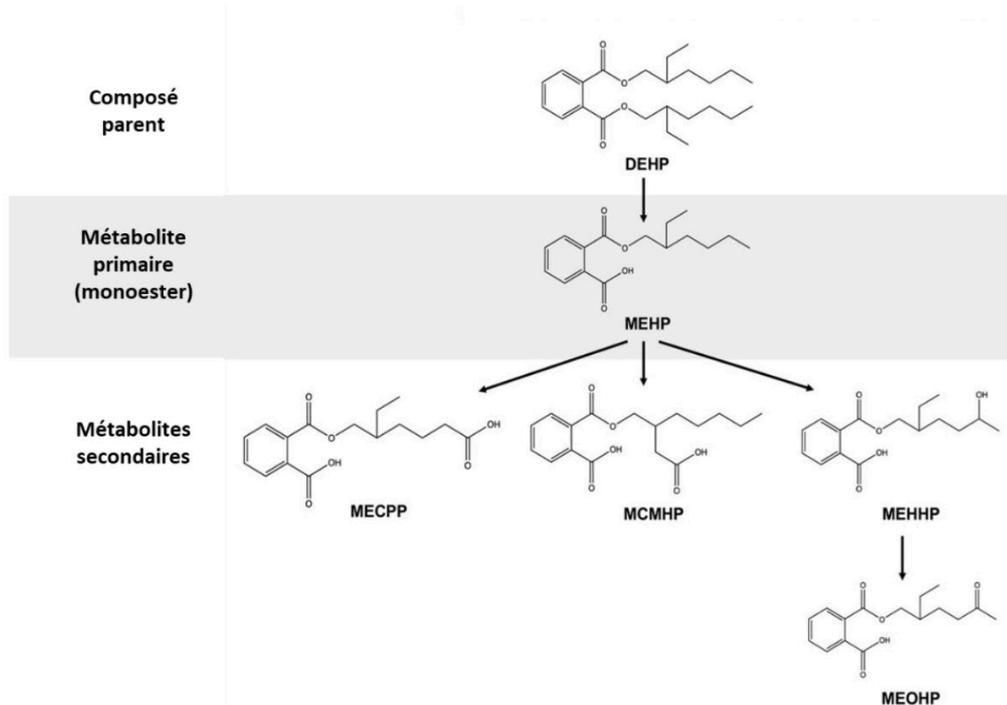


Figure 37 : Métabolites secondaires formés au cours des réactions de phase II (exemple avec le DEHP) [In Chang *et al.*, 2021 (195)]

Par ailleurs, il est intéressant de noter que le métabolisme du DEHT n'est pas tout à fait analogue à son isomère de position, le DEHP. En effet, il a été suggéré que la substitution de l'acide benzènedicarboxylique en position *para* favoriserait l'hydrolyse totale du DEHT en acide téréphtalique (métabolite non spécifique, non mesuré au cours des études de biosurveillance) par rapport au DEHP qui est substitué en position *ortho* (196).

1.4. Phase d'élimination

À la suite des réactions de phase I, les métabolites formés peuvent soit être excrétés tel quel, soit faire l'objet des réactions de phase II, il s'agit des réactions de conjugaison avec des molécules polaires. Pour les phtalates, la conjugaison a lieu essentiellement avec des groupements glucuronides, par l'UDP-glucuronyltransférase (194). Toutefois, il faut noter que les données sont limitées concernant les fractions conjuguée et non conjuguée mesurées dans les urines, qui est la principale voie d'élimination des plastifiants. En effet, au cours des études de biosurveillance réalisées chez l'Homme, les métabolites conjugués ne sont pas analysés

puisque'une étape de déconjugaison enzymatique (β -glucuronidase) est requise en amont de l'analyse des échantillons (164,196,197).

Contrairement aux voies de métabolisation, des différences concernant l'élimination des plastifiants ont été observées entre plusieurs catégories de plastifiants. Pour illustrer ces différences, le cas des phtalates sera évoqué dans un premier temps puis il sera comparé avec les plastifiants téréphtalates et trimellitates, respectivement pour le DEHT et le TOTM.

Les phtalates sont principalement éliminés par voie urinaire. En effet, la majorité de la dose administrée a été retrouvée dans les urines. C'est par exemple le cas du DEHP et du DINP dont respectivement 67% et 40% de la dose administrée par voie orale chez l'Homme a été mesurée dans les urines durant 24 heures environ (164,198). Il faut noter cependant que la nature des métabolites excrétés est fonction de la structure des phtalates. Les phtalates dont les chaînes alkyles sont inférieures à six atomes de carbone sont principalement éliminés sous la forme de leur métabolite monoester (194). Concernant les phtalates composés de chaînes alkyles supérieures ou égales à six atomes de carbone, la majorité de la dose urinaire excrétée a été mesurée sous la forme de métabolites secondaires (164,198) (Figure 36). À titre d'exemple, la somme des métabolites secondaires du DEHP mesurée dans les urines représente 61% de la dose administrée chez l'Homme alors que le MEHP, métabolite primaire, ne représente que 6% (198).

Comparativement aux phtalates, l'élimination des téréphtalates et des trimellitates est différente. Pour ces deux catégories de plastifiants, la fraction urinaire de la somme des métabolites du composé parent représente une faible part de l'excrétion (192,196). Dans ces études, cela a été rapporté pour le cas du DEHT (un téréphtalate) et du TOTM (un trimellitate) avec une fraction urinaire respectivement de 16% et de 6% de la dose administrée ayant été mesurée chez les individus exposés par voie orale. Cela suggère une élimination principalement par voie biliaire. Cela concorde avec les résultats d'une étude menée *in vivo* chez le rat pour le DEHT (voie orale) (175). En effet, la radioactivité totale mesurée dans les fèces est de 56,5% dans cette étude, dont 36,6% sous forme inchangée ($[^{14}\text{C-DEHT}]$). De même, une étude *in vivo* chez le rat a décrit la voie biliaire comme étant la principale voie d'élimination lors de l'administration du $[^{14}\text{C-TOTM}]$ (voie intraveineuse) dont 21% de la dose administrée correspond au métabolite monoester (199). À titre d'information, la radioactivité totale urinaire a été mesurée dans ces études *in vivo* chez le rat à hauteur de 32% pour le DEHT et de 3% pour le TOTM.

Malgré ces différences entre les catégories de plastifiants, les plastifiants ne sont pas des molécules persistantes dans l'organisme, au vu des résultats concernant leur distribution et leur élimination. Pourtant, l'inquiétude demeure à leur égard car les plastifiants sont des substances omniprésentes dans nos environnements et les sources d'exposition sont multiples. Ainsi, l'exposition aux plastifiants peut se caractériser comme étant pseudo-persistante, et ce malgré leur demi-vie biologique relativement courte. Dans le cadre d'études de biosurveillance, les plastifiants ont été mesurés dans plusieurs matrices biologiques (urines, sang et lait maternel par exemple) soulignant l'imprégnation de la population (149,200). Ces résultats interpellent d'autant plus que les plastifiants font l'objet de préoccupations de santé publique car ils sont susceptibles de perturber les fonctions physiologiques des populations exposées. Plusieurs études épidémiologiques rapportent des liens d'association positifs entre l'exposition aux plastifiants et le développement de certaines pathologies (systèmes reproducteur et cardiovasculaire), suggérant leurs effets délétères sur la santé humaine (201,202).

2. Effets des plastifiants sur la santé

Les plastifiants peuvent avoir des effets sur différents organes, en raison de leur distribution dans l'organisme comme cela a été évoqué précédemment (cf Chapitre 3, §1.2. Phase de distribution). Plusieurs études ont décrit leurs effets sur ces organes, notamment sur le système reproducteur, le foie, les reins qui seront évoqués dans ce paragraphe. Leurs effets sur le système cardiovasculaire seront aussi évoqués, et feront l'objet d'un paragraphe spécifique (cf Chapitre 3, §3. Effets sur le système cardiovasculaire).

2.1. Effets sur le système reproducteur

Les effets des plastifiants sur le système reproducteur ont suscité une attention particulière. Des études épidémiologiques suggèrent des liens d'association entre l'exposition aux plastifiants et des atteintes du système reproducteur affectant la puberté, la fécondation et la grossesse (201,203–205). Par exemple, les plastifiants pourraient nuire à la fertilité en impactant la qualité du sperme chez l'homme et en induisant le développement d'une endométriose chez la femme (201). Des liens d'association ont aussi été rapportés en ce qui concerne le déroulement de la grossesse avec des naissances prématurées (204). Ces effets sont d'autant plus préoccupants que des répercussions sur le développement *in utero* ne sont pas à

exclure car l'exposition maternelle expose le fœtus. L'exposition aux plastifiants durant cette période serait en lien avec le syndrome de dysgénésie testiculaire observé à la naissance, qui correspond au développement anormal des testicules (201). Plusieurs études expérimentales réalisées *in vivo* et *in vitro* ont été menées pour étayer les données épidémiologiques.

Tout d'abord, des études ont montré les effets des plastifiants sur le comportement sexuel murin. En effet, un retard à l'accouplement a été observé chez les souris (des deux sexes) ayant été exposées individuellement au DEHP (5 µg/kg/j) ou au DINP (200 mg/kg/j) (206,207).

D'autre part, les plastifiants ont montré impacter la fertilité. Par exemple, un allongement des phases du cycle menstruel (DINP, 100 µg/kg/j et 200 mg/kg/j) et la diminution de la capacité à concevoir (DEHP et DINP testés séparément, 20 µg/kg/j) ont été observés chez les souris femelles exposées à l'âge adulte, plusieurs mois avant la période de reproduction (207). Concernant la fertilité masculine, une altération de la maturation des spermatozoïdes a été rapportée par une étude *in vitro* (DEHP, 10 µM) (208).

Un retard de développement embryonnaire a été observé à la suite de l'exposition individuelle *in vitro* au DMP, au DEP et au DEHP (chacun à une concentration de 10 µM) (208). De plus, l'exposition aux plastifiants pourrait impacter négativement le maintien de la grossesse. Des modifications des fonctions des cellules ovariennes humaines ont été observées *in vitro* à la suite de l'exposition au DBP (100 µg/ml) avec une diminution de la sécrétion de deux hormones stéroïdiennes (progestérone et œstradiol) (209).

D'autre part, des inquiétudes ont été soulevées concernant les effets des plastifiants vis-à-vis de l'issue de la grossesse. En effet, une embryolétalité accrue a été rapportée chez les rates gestantes exposées au phtalate de diisooctyle (DIOP) (1 g/kg/j), un isomère du DEHP et du DNOP (210). Et un effet défavorable sur le terme de la grossesse avec une diminution de la portée de souriceaux a été observée chez les souris femelles ayant été exposées individuellement au DINP ou au DEHP (20 µg/kg/j chacun) avant la période d'accouplement (207).

Aussi, ces inquiétudes se doublent des répercussions possibles sur la descendance exposée durant la gestation. L'exposition *in utero* aux plastifiants exposerait potentiellement à des effets après la naissance. De tels effets ont été rapportés par plusieurs études sur le système reproducteur des rongeurs (210,211). Par exemple pour le DBP (dès 50 mg/kg/j), une distance ano-génitale réduite et une puberté précoce ont été décrites chez les souris exposées *in utero* (211).

En somme, l'ensemble de ces études expérimentales soulignent l'étendue des effets des plastifiants sur le système reproducteur. Ils peuvent impacter l'accouplement, la fertilité, la grossesse, le développement *in utero* ainsi qu'avoir des répercussions sur la progéniture. Les effets des plastifiants sur le système reproducteur sont liés à leurs effets œstrogéniques, anti-androgéniques et antithyroïdiens (212). Ils exercent leur action sur le système reproducteur principalement en se liant à des récepteurs nucléaires (récepteurs des œstrogènes, des androgènes et des hormones thyroïdiennes ainsi que les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR en anglais pour « Peroxisome proliferator-activated peceptor gamma »)), en se substituant aux molécules endogènes (212). L'ensemble de ces récepteurs nucléaires reposent sur un mécanisme d'action commun, ils régulent l'expression génique (activation ou répression) en se fixant à l'ADN. La figure 38 illustre de manière générale le mécanisme d'action impliquant les récepteurs nucléaires.

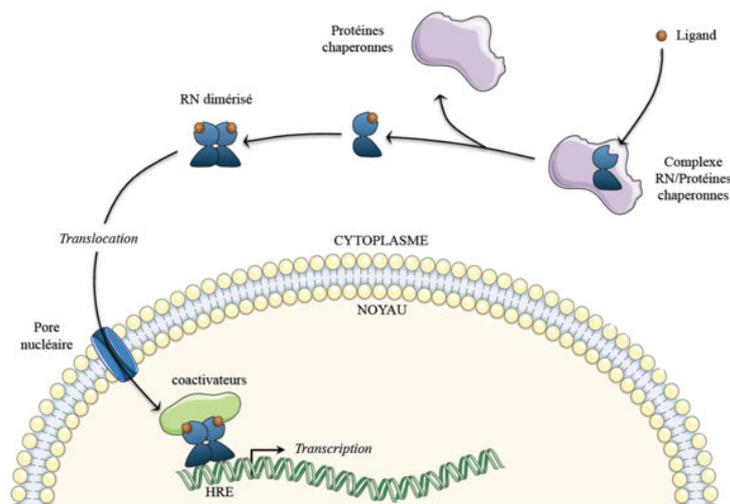


Figure 38 : Mécanisme d'action général des récepteurs nucléaires
[source : Muczynski (2011) (213)]

Un autre mécanisme d'action a été décrit comme étant impliqué dans les effets des plastifiants sur le système reproducteur, il s'agit du stress oxydant (212). Au niveau cellulaire, cela se traduit par un déséquilibre du statut redox, entre la production des espèces oxydantes (les espèces réactives de l'oxygène dites ROS en anglais pour « Reactive oxygen species ») et les capacités anti-oxydantes, conduisant à des dommages cellulaires par oxydation de ses constituants.

2.2. Effets au niveau hépatique

Le foie est le principal organe qui assure la métabolisation des xénobiotiques. De par ses fonctions, cet organe est en contrepartie exposé à ces molécules tels que les plastifiants, et peut être la cible de leur toxicité. Une étude épidémiologique a notamment suggéré le lien d'association entre l'exposition aux phtalates et le développement d'une stéatose hépatique non alcoolique (214). La stéatose hépatique non alcoolique résulte de l'accumulation anormale de lipides dans les hépatocytes. Chez les sujets qui ont été suivis dans le cadre de cette étude, la dyslipidémie s'accompagne de taux élevés de transaminases et d'une hyperglycémie, qui sont deux facteurs de risque dans le développement de cette pathologie.

Les effets des plastifiants au niveau hépatique ont également été rapportés lors d'expérimentations *in vivo* et *in vitro* (215–220). Les perturbations du métabolisme lipidique ont été observées chez des souris exposées au DEHP (500 mg/kg/j) (216). L'accumulation de cholestérol au niveau hépatique résulte d'une dérégulation de son métabolisme, et cela a aussi été mis en évidence chez des souris ayant été exposées *in utero* au DEHP (30 mg/kg/j) (217). De plus, le développement de métastases hépatiques a été rapporté *in vivo* chez des souris exposées au BBP (500 mg/kg un jour sur deux) (218). Pour d'autres plastifiants, des effets moins sévères ont été observés puisque seule une augmentation de la masse du foie a été rapportée pour le DIBP, le DEP et le DINP (215,219,220).

Parmi les effets hépatiques marqués, les mécanismes cellulaires des plastifiants ont été explorés. Les résultats de différentes études ont suggéré l'implication des récepteurs nucléaires activés par des xénobiotiques (218,221–223). L'hépatotoxicité induite par le DEHP chez les rongeurs impliquerait le récepteur PPAR, et plus particulièrement l'isoforme PPAR- α (222). Ce récepteur est impliqué dans la régulation du métabolisme des lipides au niveau hépatique. Cependant, le développement de tumeurs hépatiques a également été rapporté lors de l'exposition au DEHP de souris n'exprimant pas PPAR- α , et dans ce cas l'implication du stress oxydant comme mécanisme sous-jacent a été évoqué (224). D'autre part, la transposabilité des résultats à l'Homme est controversée pour le mécanisme impliquant PPAR- α (222). Chez l'Homme, l'effet serait médié par un autre récepteur nucléaire, il s'agit du récepteur constitutif des androstanes (CAR en anglais pour « Constitutive androstane receptor ») lui aussi impliqué dans le métabolisme lipidique (221,223). L'implication d'un troisième récepteur nucléaire, lui aussi activé par des xénobiotiques, a été évoqué dans le cadre de la pathogenèse hépatique médiée par le BBP, il s'agit du récepteur aryl hydrocarbon (communément appelée récepteur AhR) (218). Dans les cellules tumorales, le récepteur AhR joue un rôle sur l'angiogenèse en

participant à la vascularisation tumorale. Lors de l'activation du récepteur AhR par le BBP, il interagirait par l'intermédiaire d'une protéine G avec une voie de signalisation impliquée dans la progression tumorale et le développement de métastases, il s'agit de la voie NF- κ B (en anglais pour « Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ») (Figure 39).

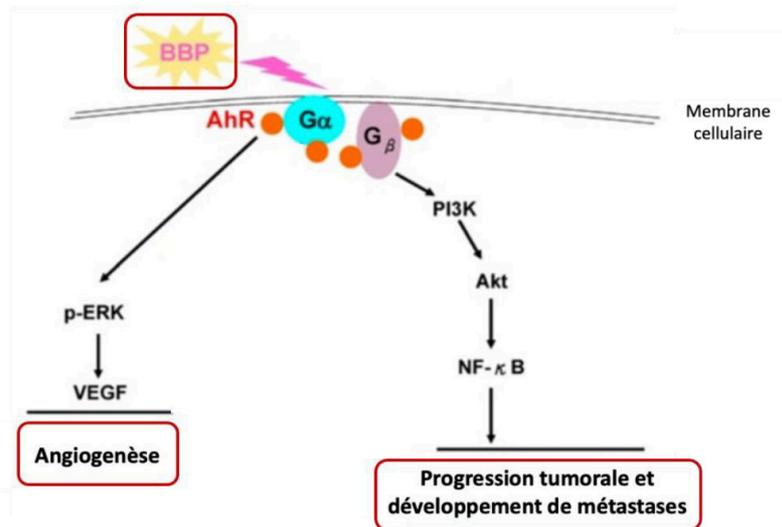


Figure 39 : Voies de signalisation impliquées dans le développement tumoral hépatique par le BBP [In Tsai *et al.* (2014) (218)]

2.3. Effets au niveau rénal

Les plastifiants ont aussi des répercussions au niveau rénal. Des modifications au niveau des glomérules et du compartiment tubulo-interstitiel ont été décrites pour le DEHP (225,226). En effet, le développement d'une glomérulonéphrite (0,05%) et d'une fibrose rénale (50 mg/kg/j) a été observé au cours d'études menées *in vivo* chez les rongeurs (225,226). Une exposition prénatale au DEHP, par le biais de l'exposition maternelle (dès 0,25 mg/kg/j), peut également induire des altérations du développement rénal (227). En effet, une diminution du nombre de néphrons a été observée chez les rats. Les néphrons sont les unités fonctionnelles du rein et leur nombre est défini au cours de la néphrogenèse. La diminution du nombre de néphrons exposerait à long terme au risque de dysfonctionnements rénaux comme cela a été rapporté dans l'étude de Wei *et al.* (2012) (227). En effet, une hypertension a été observée lors du suivi post-natal des rats ayant été exposés *in utero*. Un autre plastifiant a lui aussi montré entraîner une toxicité rénale, il s'agit du DBP (228). Dans cette étude, une dysplasie rénale a été observée lors d'une exposition *in utero* au DBP (rates gestantes, 850 mg/kg/j) (228). À la naissance, une diminution de la taille et de la masse des reins a été rapportée chez la progéniture

ayant été exposée. De plus, cette dysplasie s'accompagne d'une propension à développer une fibrose rénale à l'âge adulte.

Au niveau rénal, différents mécanismes cellulaires ont été suggérés pour les plastifiants, impliquant ou non des récepteurs nucléaires. Le rôle des récepteurs PPAR a été suggéré au niveau rénal pour les isoformes alpha et gamma, car elles sont impliquées dans la réponse inflammatoire (225,226). Les mécanismes d'action des plastifiants seraient composé-dépendant. En effet, la pathogenèse rénale induite par le DBP serait médiée par des voies de signalisation différentes. Par exemple, le développement anormal des reins constaté à la naissance serait dû à un effet anti-androgénique avec une diminution des concentrations sériques de testostérone (229). De plus, pour un même composé, différents mécanismes ont été suggérés puisque par exemple les mécanismes d'inflammation et de stress oxydant ont aussi été rapportés au cours des expérimentations *in vivo* lors d'une exposition au DEHP (230). Cela a aussi été décrit pour le DINP par des études *in vivo* (230,231). Dans certains cas, cela pourrait conduire à des mécanismes de mort cellulaire telles que l'autophagie et l'apoptose puisqu'ils ont été évoqués respectivement pour le DBP et le DIDP (232,233).

Les effets des plastifiants au niveau rénal peuvent engendrer des complications sur le système cardiovasculaire par action indirecte car le rein est un organe clé qui assure la régulation de la pression artérielle. Ainsi les dommages rénaux constituent des facteurs de risque de pathologies cardiovasculaires. En effet, les anomalies du développement rénal qui ont été observées chez des rats exposés au DEHP sont associées à une diminution de l'expression de la rénine et de l'angiotensine II, deux médiateurs régulant la pression artérielle (227). Il faut savoir que les plastifiants peuvent aussi altérer le système cardiovasculaire par action directe. Ces effets vont être décrits dans le prochain paragraphe.

3. Effets sur le système cardiovasculaire

Les maladies cardiovasculaires constituent une source de préoccupation majeure en santé publique car elles sont une des principales causes de mortalité dans le monde. Le rôle des facteurs environnementaux ne serait pas à exclure. Une étude publiée récemment a rapporté que l'exposition aux plastifiants causerait des décès prématurés imputables aux maladies

cardiovasculaires, tel que cela a été observé chez une partie de la population adulte (55-64 ans) (234). Toutefois, les études épidémiologiques jusqu'alors menées ont davantage concerné les effets des plastifiants sur le plan de la morbidité cardiovasculaire. Des études ont rapporté des liens d'association entre l'exposition aux plastifiants et le développement de maladies cardiovasculaires, telles que l'arythmie cardiaque, l'hypertension ou encore l'athérosclérose (200,202). Et d'après ces études, cela concernerait autant l'exposition à l'âge adulte que l'exposition *in utero*. Le développement de ces maladies pourrait s'expliquer par des remaniements cardiovasculaires et métaboliques. Les études *in vitro* et *in vivo* contribuent à apporter des éléments de réponse concernant les mécanismes sous-jacents. Cette partie va faire état des perturbations causées par les plastifiants sur la fonction cardiovasculaire en abordant les effets au niveau cardiaque et les effets au niveau vasculaire.

3.1.1. Effets cardiaques

Les effets des plastifiants sur la fonction cardiaque s'inscrivent préférentiellement dans le cadre d'expositions iatrogènes. En effet, le cœur est une cible à risque durant les interventions médicales (39). Ces études ont principalement été réalisées sur des modèles cellulaires de cardiomyocytes et par expérimentation animale. De manière ponctuelle, le DINP, le BBP et le DBP ont montré avoir des effets sur la morphologie cardiaque en réalisant les études sur des cardiomyocytes (202,235). Cependant, il faut savoir que le DEHP reste le plastifiant qui a majoritairement été étudié concernant les remaniements fonctionnels au niveau cardiaque (236–238).

Les effets du DEHP sur la fonction cardiaque ont été observés autant sur le plan structural avec des perturbations des jonctions communicantes que sur le plan fonctionnel avec des modifications de l'activité électrique et du métabolisme énergétique (236,237). Un changement du métabolisme cardiaque a été observé à la suite de l'exposition *in vitro* de cardiomyocytes de rat au DEHP (50-100 µg/ml) (236). Physiologiquement, le tissu cardiaque est un tissu dont le métabolisme énergétique est à prédominance lipidique. En présence de DEHP, la dépendance des cellules aux substrats lipidiques est exacerbée au détriment des substrats glucidiques (236). Par ailleurs, pour des conditions de concentrations comparables à celles de l'étude précédente, à savoir du DEHP à 50 µg/ml, appliqué sur des cardiomyocytes humains *in vitro*, des perturbations de l'activité électrique cardiaque ont été observées, avec une diminution de la communication intercellulaire entre les cardiomyocytes (237). Or les jonctions communicantes participent à la propagation de l'activité électrique, cela explique comment des modifications d'ordre structural ont des répercussions sur la conductivité et la contractilité cardiaque. D'autre

part, l'activité électrique du muscle cardiaque est modifiée par effet inotrope négatif (diminution de la contractilité) et effet chronotrope négatif (diminution de la fréquence cardiaque) du DEHP (237). De plus, les résultats d'une étude réalisée *in vivo* chez des souris exposées au DEHP (voie orale, 1 µg/ml) rapportent une réduction de la capacité d'adaptation de la fréquence cardiaque, qui est le reflet d'une altération de l'activité du système nerveux autonome (238). Le contrôle du rythme cardiaque est sous dépendance du système nerveux autonome. Ici, le déséquilibre observé concernant l'innervation autonome du muscle cardiaque, à la suite de l'exposition au DEHP, a été rapporté comme étant en lien avec la prédominance du tonus sympathique.

3.1.2. Effets au niveau vasculaire

Les effets des plastifiants ne se limitent pas uniquement au tissu cardiaque mais ciblent également le système vasculaire en raison du contexte de multi-exposition. Dans ce paragraphe, les perturbations des fonctions physiologiques vasculaires et les mécanismes cellulaires sous-jacents au niveau des cellules endothéliales seront décrits successivement.

3.1.2.1. Perturbations des fonctions physiologiques vasculaires

Les cellules endothéliales sont les cellules constitutives de l'endothélium, qui tapisse la paroi interne des vaisseaux. Elles sont donc au contact de la circulation sanguine. Elles sont impliquées dans les fonctions physiologiques telles que l'hémostase et le tonus vasculaire (239). Plusieurs études suggèrent la mise en jeu de mécanismes au niveau des cellules endothéliales concernant l'augmentation de la pression artérielle induite par les plastifiants. Les effets de différents plastifiants (DEHP, DINP et DBP) sur les cellules endothéliales ont été étudiés *in vivo* chez les rongeurs (217,235,240,241). Les études rapportent des dérégulations du tonus vasculaire avec une augmentation de la pression artérielle pour le DEHP (dès 0,1 mg/kg/j toutes études confondues) et pour le DINP (dès 1,5 mg/kg/j) (217,235,240,241). Au contraire, aucune manifestation clinique sur la pression artérielle n'a été observée pour le DBP (241).

L'hypertension n'est pas la seule manifestation clinique qui a été décrite au niveau du système vasculaire à la suite de l'exposition aux plastifiants. En plus des effets délétères sur le tonus vasculaire, les études expérimentales suggèrent l'implication des plastifiants dans le développement de l'athérosclérose. L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique qui s'accompagne de dépôts lipidiques et fibreux au niveau des artères, ce qui entraîne un épaississement de la tunique interne des vaisseaux (intima). Il s'avère que le DEP

a montré modifier la structure des lipoprotéines comme cela a été rapporté par une étude réalisée *in vitro* sur des lipoprotéines d'origine humaine (242). Dans cette étude, une diminution de l'expression de protéines entrant dans la composition des lipoprotéines de haute densité (HDL) et des lipoprotéines de basse densité (LDL) par induction de leur dégradation a été observée en présence de DEP (50 μ M). Cette étude a aussi montré que les fonctions des HDL sont altérées en présence de DEP. Or les lipoprotéines ont un rôle déterminant dans l'initiation du processus athéromateux. Physiologiquement, les HDL ont une activité protectrice vis-à-vis du développement de l'athérosclérose notamment en agissant sur les LDL, qui sont pro-athérogènes (242,243). Ainsi les altérations des HDL ne seraient pas sans conséquences sur leur effet protecteur. Les effets d'un autre plastifiant sur les lipoprotéines ont aussi été observés dans le cadre d'une étude menée *in vivo* chez les souris exposées au DEHP (500 mg/kg/j) (216). L'exposition chronique des souris a induit une élévation des concentrations sériques des lipides (HDL, LDL, cholestérol total et triglycérides).

3.1.2.2. Mécanismes cellulaires au niveau endothélial

Les pathologies vasculaires médiées par les plastifiants ne sont pas sans effet sur les cellules endothéliales. En effet, elles peuvent être impactées car elles sont au contact de la circulation sanguine. Différents dommages cellulaires ont été décrits au niveau endothélial à la suite de l'exposition aux plastifiants. Les différentes réponses cellulaires rapportées sur les cellules endothéliales incluent l'inflammation, le stress oxydant et les mécanismes de mort cellulaire (216,244–247).

Les plastifiants peuvent provoquer une inflammation au niveau endothélial (216,244). L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme pour faire face à une agression. Chez des souris exposées au DEHP (500 mg/kg), des modifications de l'expression de molécules d'adhésion endothéliales ont été observées, en rapportant une surexpression de ICAM-1 (en anglais pour « Intercellular adhesion molecule-1 ») et VCAM-1 (en anglais pour « Vascular cell adhesion molecule-1 ») (216). L'augmentation de ces molécules d'adhérence reflète un processus inflammatoire au niveau endothélial. En effet, l'expression des molécules d'adhérence est modulée par des médiateurs pro-inflammatoires. La surexpression des molécules d'adhésion dans cette étude s'accompagne précisément d'une élévation des cytokines pro-inflammatoires circulantes (TNF- α , IL-1 β et IL-6 entre autres). Ces résultats (molécules d'adhésion et cytokines pro-inflammatoires) concordent avec l'augmentation d'IL-6 obtenue pour le DEHP (25 μ M) *in vitro* sur un modèle de cellules endothéliales vasculaires (HUVEC) (244). Ces altérations pourraient conduire *in fine* à des dysfonctionnements

endothéliaux. Par exemple, une diminution de la migration des cellules endothéliales vasculaires (EA.hy926) a été observée *in vitro* à la suite d'expositions répétées au DBP (concentrations entre 10^{-8} et 10^{-7} M) (248).

L'exposition aux plastifiants peut également induire un stress oxydant au niveau endothélial. Cela peut être médié de manière indirecte comme par exemple avec le mécanisme oxydatif impliqué dans la pathogenèse de l'athérosclérose lors de l'exposition au DEHP (500 mg/kg) (216). En effet, l'oxydation des LDL qui a été observée pourrait impacter dans un second temps les cellules endothéliales qui sont exposées par la circulation sanguine. Ces dernières peuvent également être une cible directe du stress oxydant comme cela a été rapporté *in vitro* sur des cellules endothéliales (245,246). Pour ces deux études confondues, une augmentation de la production des ROS à des concentrations comprises entre 6,25 et 100 μ M a été rapportée. Ces espèces sont néfastes car elles peuvent causer des effets délétères, tels que des dommages à l'ADN, une oxydation des protéines et une peroxydation lipidique au niveau des membranes cellulaires. Toutefois, les cellules ont la capacité de neutraliser ces espèces oxydantes par la mise en jeu de mécanismes antioxydants, notamment enzymatiques comme la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase. Cela a notamment été rapporté lors de l'exposition au MEHP (pour des concentrations de 12,5, 50 et 100 μ M) puisque parallèlement à la production des ROS, une augmentation de la superoxyde dismutase et une déplétion de glutathion intracellulaire ont été observées (246). Cependant, un stress oxydant excessif peut conduire à un dépassement des capacités anti-oxydantes cellulaires et donc entraîner une mort cellulaire.

Il existe différentes voies de mort cellulaire, l'autophagie et l'apoptose sont les deux voies de mort cellulaire qui ont été décrites après exposition au MEHP, le métabolite monoester du DEHP pour des concentrations comprises entre 50 et 200 μ M (245–247). Les mécanismes de ces deux morts cellulaires vont être décrits un à un.

En conditions physiologiques, l'autophagie a un rôle dans la survie cellulaire puisque les macromolécules et organites cellulaires altérés sont internalisés dans des vésicules nommées autophagosomes. Toutefois, l'autophagie peut aussi entraîner la mort cellulaire sous certaines conditions, notamment lors de l'exposition aux plastifiants. La cytotoxicité du MEHP (200 μ M) par autophagie a été rapportée par l'étude de Lui *et al.* (2017) sur un modèle de cellules endothéliales (EA.hy926) (245). Cela est dû à une dérégulation de la voie de signalisation médiée par la protéine Akt, connue comme étant impliquée dans la survie cellulaire. La production excessive de ROS induit par le MEHP aurait un effet délétère sur la fonction des

autophagosomes, sur la dégradation des constituants cellulaires endommagés. Ainsi, leur accumulation anormale dans le cytosol entraînerait un signal de mort avec une diminution de l'expression de la forme active de la protéine de signalisation Akt. De manière concomitante, une chute du potentiel mitochondrial a aussi été observée dans le cadre de cette étude et suppose que le MEHP pourrait entraîner un autre type de mort cellulaire, à savoir l'apoptose. Ce devenir cellulaire a été décrit au niveau endothélial par deux études pour le même composé, à savoir le MEHP (246,247).

L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui est déclenchée comme un mécanisme de défense pour éliminer les cellules endommagées. L'effet cytotoxique du MEHP (50 μ M) qui a été observé sur les cellules endothéliales (HUVEC) repose sur ce mécanisme (246). La réduction de la viabilité cellulaire due au MEHP est associée à un stress oxydant, engendrant des perturbations au niveau mitochondrial. L'apoptose médiée par la voie mitochondriale (voie intrinsèque) découle d'altérations localisées au niveau de la membrane mitochondriale (perméabilité, chute du potentiel membranaire). Le relargage du cytochrome c, une protéine impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale, de la mitochondrie vers le cytosol, constitue le facteur déclenchant de l'apoptose lors de l'exposition au MEHP (246). Le mécanisme de mort par la voie mitochondriale pourrait être précédé par des perturbations de l'état bioénergétique des cellules. En effet, l'adaptation métabolique des cellules endothéliales a été documentée, ce mécanisme assure le maintien des fonctions cellulaires en cas de stress en réponse à des signaux endogènes, comme décrit au cours de pathologies cardiovasculaires (athérosclérose et angiogenèse) (249,250). L'adaptation métabolique en réponse à l'exposition aux plastifiants n'a pas été décrite au niveau endothélial mais pourrait être supposée car les plastifiants peuvent constituer des signaux de stress.

En résumé, les plastifiants ont montré qu'ils pouvaient impacter différents organes, en développement ou non, comme en témoignent diverses études expérimentales. Globalement, une diversité d'effets a été observée, sans mise en évidence d'une toxicité d'organe spécifique aux plastifiants. Ils ciblent les principaux organes et systèmes de l'organisme tels que le foie, les reins, le système reproducteur et le système cardiovasculaire. Cependant, les données disponibles sont inégales. Alors que les effets des plastifiants sur le système reproducteur ont largement été documentés, leurs conséquences sur le système vasculaire restent assez peu connues car étant moins étudiées. Pour autant, les cellules endothéliales sont en contact direct avec le sang et, par ce biais, elles sont exposées aux plastifiants présents dans la circulation sanguine en raison du contexte de multi-exposition. Ainsi, les plastifiants peuvent endommager

les cellules endothéliales. Cela a été évalué expérimentalement avec l'implication de l'inflammation et du stress oxydant au niveau endothélial, notamment avec des atteintes de la fonction mitochondriale. Cela est préoccupant puisqu'à terme cela pourrait conduire à une perte de la fonction endothéliale, voire à une mort cellulaire, comme cela a été évoqué par certaines études. Toutefois, les données actuelles concernent bien souvent un seul phtalate, le DEHP, et les effets sont principalement dus à son métabolite monoester. Les résultats de ces études ouvrent la voie à de nouvelles interrogations. Quels sont les effets des autres plastifiants au niveau endothélial ? Qu'en est-il des expositions à plusieurs substances en mélange qui caractérisent le contexte particulier de multi-exposition aux plastifiants ? En effet, des études complémentaires apporteraient des données nécessaires permettant l'évaluation des plastifiants afin de protéger la santé des populations.

4. Aspects réglementaires

Les mesures réglementaires qui sont prises concernant les plastifiants tiennent compte des données de toxicité. Ces dernières permettent d'éclairer les décisions des pouvoirs publics concernant les mesures à prendre pour protéger la santé des populations. À cet effet, des mesures (restrictions ou interdictions) ont été prises concernant l'usage de certains plastifiants. Les phtalates sont principalement ciblés du fait qu'ils ont été les plus documentés. L'annexe II fait la synthèse de différentes mesures réglementaires applicables en France. Elles vont être décrites brièvement dans ce paragraphe.

Les plastifiants sont des substances chimiques soumises à une autorisation avant de pouvoir être mises sur le marché européen par application du règlement relatif à l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des produits chimiques (REACH) (251). Dans ce cadre, des listes ont été créées pour les substances pouvant avoir des effets délétères sur la santé, dans le but d'encourager la substitution de ces substances considérées comme extrêmement préoccupantes pour la santé. Quatorze phtalates sont actuellement inscrits sur la liste des substances soumises à autorisation car classés comme étant présumés toxiques pour la reproduction humaine (Cancérogène, mutagène et/ou toxique pour la reproduction de catégorie 1B, (CMR1B)) et/ou ayant des effets de perturbation endocrinienne (252).

En parallèle de ce règlement européen, des réglementations sectorielles s'appliquent à l'échelle nationale. Elles vont être présentées en distinguant les mesures d'interdiction totale et les mesures restrictives. Seule la réglementation en vigueur en France sera évoquée. En notant que les mesures applicables aux dispositifs médicaux seront abordées dans un paragraphe distinct.

Des mesures d'interdiction totale sont appliquées concernant l'utilisation des plastifiants dans les produits de consommation. Actuellement, l'utilisation du DIBP est bannie dans les matériaux et objets en plastique en contact avec les denrées alimentaires en accord avec l'arrêté du 25 avril 2008 (253,254). De plus, les produits cosmétiques ont aussi été visés par ces mesures d'interdiction. Par exemple, depuis juillet 2013, il est interdit de mettre sur le marché des produits cosmétiques contenant certains phtalates (255). Cependant, il faut noter que dans le champ réglementaire, ce sont préférentiellement des mesures limitatives qui s'appliquent concernant l'utilisation des plastifiants. Dans ce but, des valeurs limites ont été établies pour restreindre l'utilisation de certains plastifiants dans les produits de consommation. Cela signifie que leur utilisation est autorisée dans le respect des valeurs limites qui ont été définies. Par exemple, l'utilisation de cinq plastifiants (BBP, DBP, DEHP, DINP et DIDP) dans les matériaux et objets en plastique en contact avec les denrées alimentaires est autorisée tant que leur migration dans les denrées alimentaires ne dépasse pas la quantité maximale autorisée (comprises entre 0,3 et 30 mg/kg selon les composés) (253,254). Outre le secteur agro-alimentaire, d'autres secteurs sont concernés par ces mesures limitatives. Il faut savoir que les valeurs limites ont été définies au cas par cas selon les secteurs. Pour les jouets et articles de puériculture, une teneur massique de 0,1% a été établie en 2006 pour cinq phtalates (BBP, DBP, DEHP, DNOP, DINP et DIDP) (256). Dans les produits de construction et décoration, un seuil d'émission inférieur à 1 µg/m³ a été fixé en 2009 pour le DEHP et le DBP (revêtements pour murs, sols et plafonds par exemple) (257). De même, l'utilisation de quatre phtalates (BBP, DBP, DEHP et DIBP) est limitée dans les équipements électriques et électroniques depuis juillet 2019, avec des teneurs massiques ne devant pas être supérieures ou égales à 0,1% (258). Le secteur vestimentaire est aussi concerné puisque des restrictions d'usage pour quatre phtalates sont en vigueur depuis novembre 2020, les concentrations ne doivent pas excéder 1000 mg/kg dans les produits textiles, les vêtements et les chaussures (259). Il est intéressant de constater que ce cadre réglementaire relatif aux plastifiants s'est étoffé au fil des ans. En effet, les mesures réglementaires ont un caractère évolutif car de nouvelles substances peuvent être ciblées ultérieurement. Cela a été le cas du DIBP qui est concerné

depuis juillet 2020 par une valeur limite dans les jouets et articles de puériculture (260). Ces évolutions concernent aussi les mesures d'interdiction puisque le phtalate de diisooctyle est banni depuis le 1^{er} mars 2022 dans les produits cosmétiques (261).

En plus des produits de consommation courante, les mesures réglementaires visant les plastifiants concernent aussi les dispositifs médicaux. Dans ce secteur, un système d'étiquetage a vu le jour et permet d'indiquer la présence de certains phtalates. Bien que cela s'inscrive dans une démarche de transparence, les industriels n'ont pas pour obligation de l'afficher (Figure 40) (262). Cette mesure s'applique notamment aux gants médicaux qui sont considérés comme étant des dispositifs médicaux.



Figure 40 : Symbole indiquant la présence de phtalates CMR dans les dispositifs médicaux, cas pour le DEHP, le BBP et le DBP

Cependant, de nouvelles mesures relatives aux dispositifs médicaux s'appliquent depuis le 26 mai 2021, conformément au règlement européen 2017/745 (263). Ces mesures concernent notamment l'utilisation des phtalates classés comme CMR et/ou PE. Afin de renforcer la transparence, les fabricants de dispositifs médicaux sont tenus d'apposer sur l'étiquetage toute utilisation de substances classées comme CMR et/ou PE à des teneurs massiques supérieures à 0,1% (m/m) et cet usage doit être justifié.

À côté de cela, d'autres mesures restrictives ont été prises concernant les plastifiants dans les dispositifs médicaux. En 2015, la Commission européenne a statué sur les teneurs autorisées pour quatre phtalates (<0,1% pour le DEHP, le DBP, le DIBP et le BBP) dans tous les dispositifs médicaux y compris les gants médicaux (258). Il s'agit de la seule mesure s'appliquant aux gants à cette date, car les autres mesures sont spécifiques à certains dispositifs médicaux. La même année, l'interdiction de tubulures contenant du DEHP dans les services de maternité, de néonatalogie et de pédiatrie est entrée en vigueur (264,265). Cependant, l'interdiction du DEHP dans les tubulures a été révisée par l'adoption de l'arrêté du 13 avril 2017 « *fixant les niveaux de concentration en di-(2-éthylhexyl) phtalate au-dessus desquels*

l'utilisation de tubulures qui en comportent est interdite », et ce malgré les effets toxiques qui ont été documentés à son égard (266). En raison de la difficulté à trouver des solutions de substitution ne contenant pas de DEHP et de propriétés similaires, il a été décidé d'autoriser à titre exceptionnel l'utilisation de tubulures contenant du DEHP à des teneurs supérieures à 0,1% dans l'attente de solutions alternatives (267).

D'une manière générale, les mesures réglementaires ont été adoptées afin de limiter l'exposition des populations aux plastifiants considérés comme étant potentiellement dangereux. Les vagues réglementaires concernant la restriction de l'utilisation des plastifiants ont débuté en 1999 en ciblant les jouets et articles de puériculture. Depuis, les mesures se sont étendues et ciblent aussi bien les cosmétiques que les dispositifs médicaux. Ces mesures ont pour but d'améliorer la sécurité sanitaire de ces produits. Elles visent à substituer l'utilisation des plastifiants classés comme étant toxiques en faveur de plastifiants alternatifs tels que le DEHT et le TOTM, supposés non toxiques, et ce dans la mesure où des solutions alternatives sont disponibles. Cependant, le manque de recul vis-à-vis de la toxicité des plastifiants de substitution ne permet pas d'affirmer qu'ils soient dénués d'effets sur la santé. C'est pourquoi, il est nécessaire d'évaluer leurs effets sur la santé afin de pouvoir garantir leur innocuité.

OBJECTIFS

Les **plastifiants** font désormais partie intégrante de notre vie quotidienne, sous tous ses aspects. Ce sont des substances dont la demande est forte et croissante car ils entrent dans la composition de nombreux produits de consommation courante, ils sont principalement utilisés en tant qu'additifs chimiques dans les matières plastiques. Pour autant, leurs usages sont controversés car ils présentent un risque de relargage puisqu'ils ne sont pas liés de manière covalente. Ainsi, l'exposition aux plastifiants est préoccupante car ils ne sont pas sans danger. Plusieurs études ont rapporté leurs effets sur la santé humaine telles qu'une perturbation endocrinienne et des effets reprotoxiques ou encore des pathologies cardiovasculaires mais l'état des connaissances reste encore parcellaire. Par ailleurs, les fabricants ne sont pas obligés d'indiquer les plastifiants utilisés dans de nombreux produits de consommation courante, sauf exception. En effet, seul un faible nombre de plastifiants font l'objet de réglementations et ces mesures ne s'appliquent qu'à certains secteurs.

Les **gants à usage professionnel** sont très largement utilisés car ils constituent une pratique professionnelle courante. Alors qu'ils constituent une source d'exposition aux plastifiants, il n'y a pas d'encadrement concernant leur composition qui reste peu documentée. Dans ce contexte, la problématique suivante se pose donc : comment peut-on évaluer la toxicité des plastifiants liée au port de gant si ces données sont manquantes ? Si cette voie d'exposition est mineure par rapport à la voie orale, il faut souligner le fait qu'elle s'ajoute aux autres voies d'exposition. Par ailleurs, la question de l'exposition à plusieurs plastifiants se pose car ils sont rarement utilisés seuls, pourtant ils sont assez peu étudiés en mélange. Face à ce manque d'informations, les **objectifs de ce travail de thèse** ont pour but de répondre aux enjeux suivants :

1. Comment quantifier de manière fiable les plastifiants ?

En raison du manque d'informations concernant la composition des gants, deux méthodes analytiques orthogonales (GC-MS et HPLC-DAD) ont été développées et validées sur des gammes de concentrations relativement étendues par l'approche basée sur le profil d'exactitude afin de quantifier les plastifiants d'intérêt avec exactitude. Ces deux méthodes ont été comparées en termes de facilité de mise en œuvre, de nombre de plastifiants analysés et de seuils de quantification atteints.

2. Quels plastifiants sont retrouvés dans les gants ?

Pour y répondre, les deux méthodes analytiques, qui ont été validées, ont été appliquées pour caractériser les plastifiants sur un échantillonnage représentatif de gants (latex,

nitrile, néoprène et vinyle). Dans ce but, les plastifiants ont été extraits par une technique d'extraction par immersion avec un solvant organique en optimisant plusieurs paramètres (masse d'essai, volume d'immersion, nature du solvant organique et durée des ultrasons) afin de maximiser leur extraction.

3. **Causent-ils des effets au niveau endothélial ?**

Ayant connaissance de leur présence dans les gants, il apparaît nécessaire d'étudier leurs effets au niveau endothélial, premier site d'exposition interne après absorption par voie cutanée mais également dans un contexte de multi-exposition. La toxicité endothéliale a été évaluée *in vitro* sur une lignée cellulaire humaine (HMEC-1) pour trois plastifiants majoritairement quantifiés dans les gants (DEHP, DEHT et DINP), seuls et en mélange. L'étude de la réponse toxique s'est focalisée sur la viabilité cellulaire, le glutathion et la fonction mitochondriale, siège central de multiples fonctions cellulaires.

L'approche expérimentale mise en œuvre dans le cadre de ce travail de thèse est illustrée en figure 41.

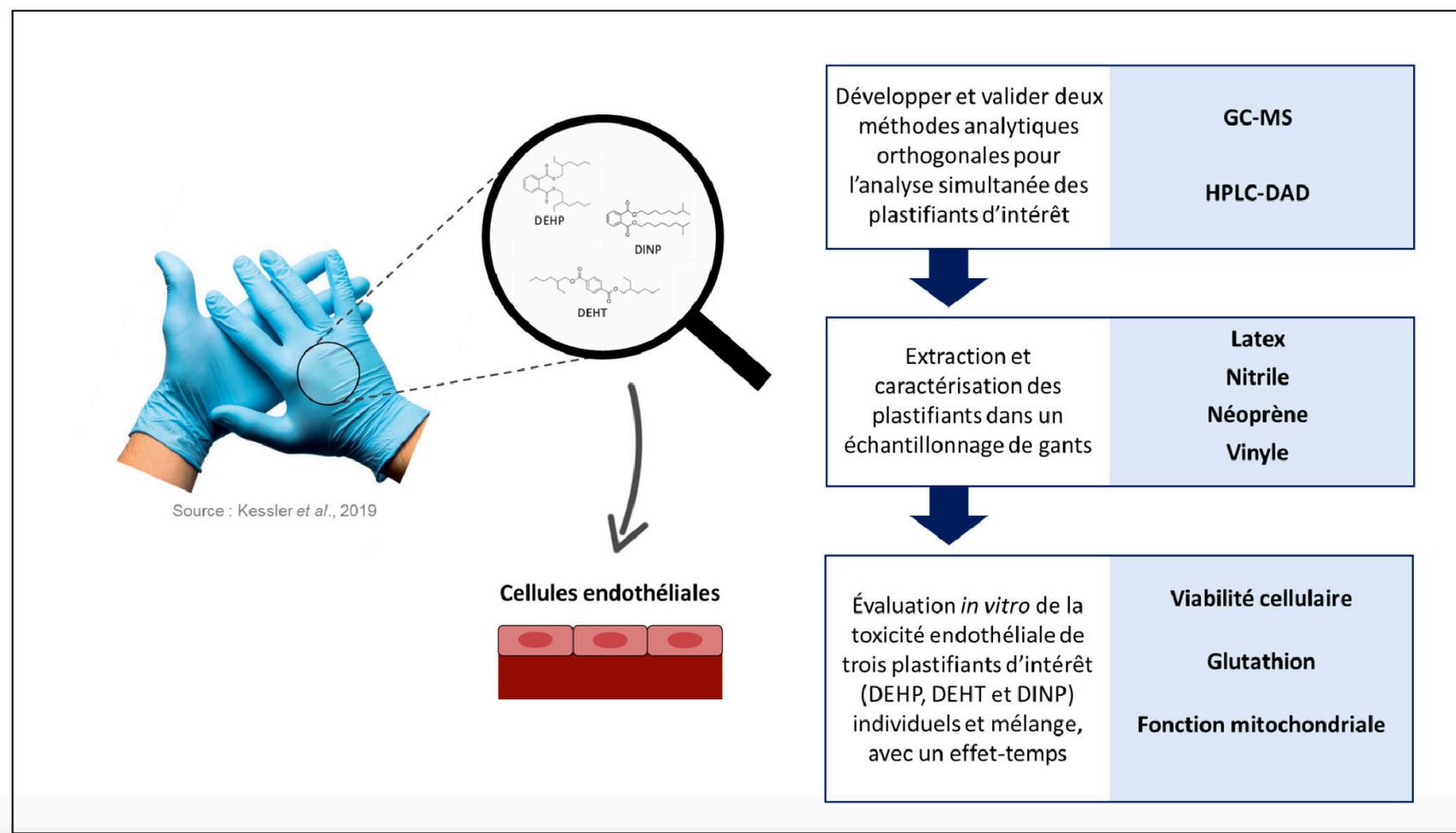


Figure 41 : Schéma descriptif de l'approche expérimentale mise en œuvre

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Partie expérimentale en chimie analytique

1.1. Matériels

1.1.1. Sources de contamination externes et contrôles analytiques

Du fait de l'omniprésence des plastifiants, les sources potentielles de contamination sont multiples. Lors des études menées pour analyser les plastifiants, des précautions visant à garantir le degré de confiance des mesures obtenues ont été prises. Il a été décidé d'utiliser des solvants organiques de haute pureté, de s'affranchir de l'utilisation de distributeur à solvants et de limiter le recours aux consommables en plastique dans la mesure du possible en privilégiant les matériaux en verre comme les tubes à hémolyse. Concernant la verrerie réutilisable, des procédures de nettoyage par rinçage à l'aide des solvants organiques ont été appliquées (268). Des contrôles analytiques ont aussi été mis en œuvre pour s'assurer de l'absence de contaminations croisées, en injectant des blancs méthodes (échantillons sans matrice ayant subi à l'identique toutes les étapes de la procédure extractive jusqu'à leur injection) et des blancs instrumentaux (échantillons de solvant seul injectés au début de chaque série d'injections et entre les répliqués d'injection).

1.1.2. Échantillonnage de gants

Quatre catégories de gants ont été incluses dans le cadre de cette étude (latex, nitrile, néoprène et vinyle) (Tableau XI). L'échantillonnage de gants a été sélectionné localement par les deux équipes partenaires, au sein de l'UFR Santé de l'Université de Rouen Normandie et de la faculté de Pharmacie de Lille, ainsi qu'au centre hospitalier universitaire de Rouen.

Tableau XI : Échantillonnage de gants étudiés

Gants étudiés	Références	Dénominations
Latex	n = 3	L1, L2, L3
Nitrile	n = 1	N1
Néoprène	n = 1	NEO1
Vinyle	n = 5	V1, V2, V3, V4, V5

1.1.3. Sélection des plastifiants d'intérêt

Dans le cadre de ce travail de thèse, treize plastifiants d'intérêt ont été choisis (Annexes III et IV). La sélection a été faite d'après un état de l'art et à la suite d'essais expérimentaux réalisés sur des extraits des gants (analyse par GC-MS à l'aide des bases de données NIST MS Search 2.0 et Wiley 275, puis confirmation par injection de solutions standards).

1.1.4. Solutions standards et solvants

Les solutions standards de plastifiants proviennent de Sigma-Aldrich (Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France), à savoir le phtalate de benzyle et de butyle (BBP, $\geq 98\%$), le phtalate de dibutyle (DBP, $\geq 99\%$), le phtalate de dicyclohexyle (DCHP, $\geq 99\%$), le phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP, $\geq 99,5\%$), le téréphtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHT, $\geq 97\%$), le phtalate de diéthyle (DEP, $\geq 99,5\%$), le phtalate de diisobutyle (DIBP, $\geq 99\%$), le phtalate de diisononyl (DINP, $\geq 99\%$), le phtalate de diméthyle (DMP, $\geq 99\%$), le phtalate de di-n-octyle (DNOP, $\geq 98\%$), le phtalate de diphenyle (DphP, $\geq 99\%$), le phtalate de dipropyle (DPP, 98%) et le trimellitate de trioctyle (TOTM, 99%) ainsi que le DEP deutéré (DEP-d₄, $\geq 98\%$) (Annexes III et IV). Les solvants organiques utilisés sont tous de qualité HPLC. L'acétone, le dichlorométhane (CH₂Cl₂) et l'acétonitrile (ACN) proviennent de VWR (Fontenay-sous-Bois, France). L'eau ultrapure (18,2 MΩ.cm) est obtenue par le système de purification d'eau Elga (Veolia).

1.1.5. Préparation des solutions mères

Les solutions mères ont été préparées séparément pour chaque plastifiant par gravimétrie à une concentration finale de 10 g/l. Pour les développements analytiques menés en GC-MS, les solutions mères ont été préparées soit dans l'acétone (DMP, DEP, DPP, DIBP, DBP, DCHP, DEHP, DEHT, DINP, DNOP, TOTM et DEP-d₄), soit dans le CH₂Cl₂ (DphP et DCHP). Pour les développements analytiques en HPLC-DAD, les solutions mères ont été préparées dans l'ACN. Les solutions mères ont été conservées au réfrigérateur à 4°C et jusqu'à deux mois après leur préparation. Les différentes solutions (solutions intermédiaires et solutions filles) ont été préparées extemporanément par dilution des solutions mères.

1.1.6. Systèmes analytiques

Dans le cadre de ce travail, les développements analytiques ont été menés afin d'identifier et quantifier les plastifiants d'intérêt dans l'échantillonnage de gants. Les développements analytiques ont porté sur les deux systèmes chromatographiques suivants :

- le système GC-MS est équipé d'un chromatographe en phase gazeuse (Agilent 7890), d'un four et d'une colonne HP-5ms (5% phényle/95% méthyl polysiloxane, 30 m x 0,25 mm *i.d.*, 0,25 μm, Agilent) et d'un spectromètre de masse (Agilent 5975C) constitué d'une source à impact électronique (70 eV) et d'un simple quadripôle. L'acquisition des données a été effectuée avec le logiciel MSD Chemstation (Agilent) ;

- le système HPLC-DAD est équipé d'un échantillonneur automatique (Waters 717), d'une pompe à gradient quaternaire (Waters 600E), d'une précolonne LiChrospher® 100 RP-18 (100 mm x 2,1 mm *i.d.*, 5 µm, Interchim), d'une colonne Kinetex C18 (100 mm x 4,6 mm *i.d.*, 2,6 µm, Phenomenex) et d'un détecteur DAD (Waters 996). L'acquisition des données a été effectuée avec le logiciel Empower™ (Waters).

1.1.7. Validation des méthodes analytiques

Les deux méthodes chromatographiques développées (GC-MS et HPLC-DAD) ont été validées avec le logiciel NeoLicy®.

1.2. Méthodes

Les développements analytiques ont été menés afin de déterminer la composition en plastifiants dans les échantillons de gants avec des techniques analytiques sensibles et précises pour les plastifiants d'intérêt.

1.2.1. Conditions opératoires optimisées en GC-MS

1.2.1.1. Paramètres de séparation

La séparation chromatographique en GC a été réalisée en mode gradient pour analyser simultanément le mélange des analytes, dont les propriétés physico-chimiques sont proches (Annexes III et IV). Toutes les optimisations ont été effectuées en injectant les plastifiants en solution, en mélange avec un étalon interne (DEP-d₄) et en faisant varier chaque paramètre en conditions monovariées. Les conditions opératoires optimisées pour la séparation chromatographique en GC sont présentées dans le tableau XII.

Tableau XII : Gradient de température optimisé pour l'analyse des plastifiants en GC-MS

Palier	Montée en température (°C/min)	Palier de température (°C)	Durée du palier de température (min)
Initial	/	100	2
1	30	200	1
2	10	250	6,5
3	40	280	16

La durée d'une analyse dans ces conditions est de 35 minutes, avec un délai solvant de 5 minutes. Ces conditions opératoires ont été obtenues par injection de 1 µl de solution en mode

split 20 :1, en chauffant l'injecteur et l'interface GC-MS à 280°C. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium et son débit est de 1 ml/min.

1.2.1.2. Paramètres de détection

Les paramètres de détection en spectrométrie de masse ont été optimisés, par injection d'une solution des plastifiants d'intérêt en mélange. Les optimisations ont été réalisées avec l'étalon interne (DEP-d₄). L'optimisation des conditions chromatographiques n'a pas permis une séparation satisfaisante pour l'ensemble des analytes, c'est pourquoi le mode « Full-scan » n'a pas été utilisé. La détection en mode suivi de l'ion seul dite « Single Ion Monitoring » (SIM) a donc été choisie. Les analytes ont été caractérisés en considérant leur temps de rétention et deux rapports m/z spécifiques, respectivement pour la quantification (dit « ion 1 ») et pour la qualification (dit « ion 2 »), qui ont été choisis à la suite de l'injection de chaque plastifiant individuellement. La détection en mode SIM comporte trois fenêtres de temps. Les conditions opératoires appliquées pour la détection en mode SIM sont décrites dans la tableau XIII, avec un dwell-time de 100 millisecondes pour chaque analyte. Ces conditions ont été obtenues avec une tension d'accélération des électrons de 70 eV, pour des températures de 230°C et 150°C respectivement pour la source d'ionisation et le simple quadripôle. La calibration du spectromètre de masse a été effectuée chaque semaine.

Tableau XIII : Paramètres de masse optimisés en mode SIM pour l'analyse des plastifiants en GC-MS

Fenêtre de temps	Analyte	Temps de rétention (en min)	Ion 1 (m/z)	Ion 2 (m/z)
1 : de 0 à 13 min	DMP	5,8	163,0	77,0
	DEP	6,6	149,0	177,0
	DEP-d ₄	6,6	153,0	181,0
	DPP	7,8	149,0	191,1
	DIBP	8,5	149,0	57,1
	DBP	9,2	149,0	223,1
	BBP	12,5	149,0	91,1
2 : de 13 à 20 min	DCHP	14,6	249,0	149,0
	DEHP	14,8	149,0	279,0
	DphP	15,0	225,0	77,1
	DNOP	18,2	149,0	279,1
	DEHT	18,3	112,1	261,1
	DINP	18,8	293,1	149,0
3 : de 20 à 35 min	TOTM	31,7	305,1	193,0

Il est intéressant de souligner que le m/z de quantification 149,0 est commun à plusieurs analytes. Il s'agit de l'anhydride de l'acide phtalique protoné, un fragment caractéristique des plastifiants appartenant à la famille des esters de l'acide phtalique résultant de la perte de leurs chaînes alkyles ($C_8H_5O_3^+$) (269) (Figure 42).

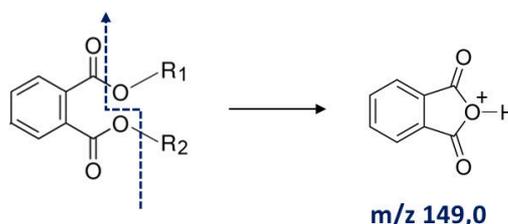


Figure 42 : Représentation du fragment caractéristique des plastifiants appartenant à la famille des esters de l'acide phtalique

1.2.2. Conditions opératoires optimisées en HPLC-DAD

Les développements analytiques menés en HPLC-DAD ont été effectués par le Dr Marie Lecoœur, le Dr Cécile Danel et le Pr Catherine Foulon (ULR 7365 GRITA de l'Université de Lille). L'unité de recherche GRITA possède une expertise dans les développements de méthodes analytiques pour l'analyse des plastifiants.

1.2.2.1. Paramètres de séparation

La séparation chromatographique en HPLC a été réalisée en mode gradient pour l'analyse simultanée du mélange des plastifiants d'intérêt avec un débit de 0,8 ml/min et une phase mobile composée d'ACN et d'eau. Les variations du pourcentage de l'ACN au cours du temps sont représentées en figure 43. Ces conditions opératoires ont été obtenues en injectant 20 μ l d'une solution des plastifiants en mélange (0,4 mg/l pour tous les plastifiants, sauf pour le DINP dont la concentration est de 2 mg/l), en chauffant la colonne chromatographique à 30°C.

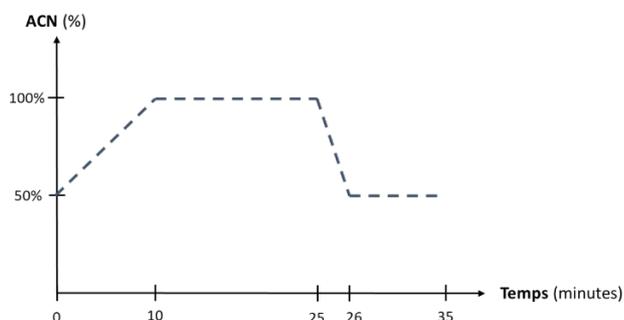


Figure 43 : Gradient de phase mobile optimisé pour l'analyse des plastifiants en HPLC-DAD (représentation pour les variations du pourcentage d'acétonitrile (ACN))

Il faut souligner qu'un pic résiduel de DEHT a été identifié de manière inattendue à la suite de l'injection d'un blanc instrumental composé par un mélange ACN/H₂O (50/50 ; v/v). De plus, une augmentation de l'intensité de ce pic résiduel a été constatée au cours du temps. L'origine de cette contamination a été recherchée et a révélé un relargage de DEHT par les tubulures du système chromatographique. Pour éviter ce phénomène, il a été décidé de placer une colonne de piégeage entre la chambre de mélange des solvants et l'injecteur comme cela a été suggéré par Descat *et al.* (2019) (89). La colonne de piégeage est une colonne C18 de dimensions 100 mm x 2,1 mm *i.d.*, 5 µm (Interchim, Montluçon, France).

1.2.2.2. Paramètres de détection

La détection a été réalisée à une longueur d'onde de 225 nm (DMP, DEP, DPP, DphP, BBP, DIBP, DBP, DCHP, DEHP, DNOP, DINP et TOTM) et à 240 nm (DEHT). Les longueurs d'onde ont été sélectionnées de sorte à obtenir une absorbance maximale pour les analytes.

1.2.3. Procédure d'extraction des plastifiants appliquée aux gants

L'extraction des plastifiants à partir des gants a été réalisée avec une technique d'extraction miniaturisée par immersion avec un solvant organique. Chaque échantillon de gant a été préparé en quatre réplicats. Les paramètres de la procédure extractive ont fait l'objet de travaux d'optimisation (masse d'essai, volume d'immersion, nature du solvant organique et durée des ultrasons). Les paramètres ont été choisis de manière à maximiser l'extraction des plastifiants (en nombre et en quantité) en prenant en compte la polarité des analytes à extraire et la compatibilité des extraits avec les systèmes analytiques pour leur analyse. Les paramètres d'extraction optimisés sont présentés en figure 44.

En vue de la quantification des analytes en GC-MS, le DEP-d₄ a été ajouté à une concentration finale de 0,01 mg/l dans tous les extraits, soit 10 µl d'une solution de DEP-d₄ à 1 mg/l ajouté dans un volume d'extrait de 990 µl. Si nécessaire, les extraits ont été dilués pour leur analyse en GC-MS et HPLC-DAD, de sorte à ce que la concentration des analytes soit incluse dans la gamme d'étalonnage.

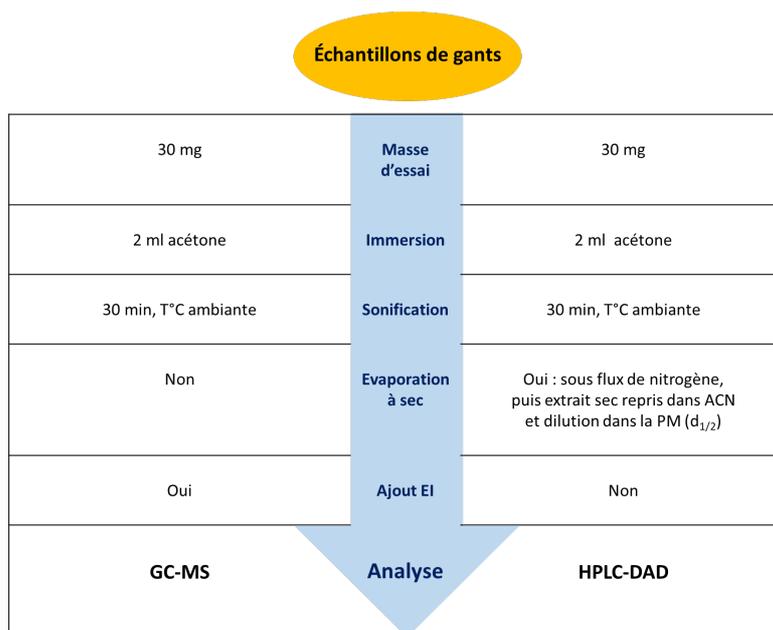


Figure 44 : Schéma représentant les procédures d'extraction des plastifiants à partir des gants
ACN : acétonitrile ; EI : étalon interne ; PM : phase mobile.

1.2.4. Validation des méthodes analytiques

À la suite de la mise au point des méthodes analytiques (GC-MS et HPLC-DAD), elles ont été validées afin de pouvoir quantifier les plastifiants dans les extraits de gants. Les enjeux analytiques visent à quantifier les plastifiants d'intérêt avec exactitude et sur des gammes de concentrations relativement étendues.

1.2.4.1. Principe de l'approche basée sur le profil d'exactitude

Pour la validation des deux méthodes analytiques développées (GC-MS et HPLC-DAD), l'approche basée sur le profil d'exactitude a été choisie, en se basant sur les lignes directrices publiées par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) (270). C'est une approche de validation alternative car elle est basée sur un critère de validation unique contrairement aux approches de validation classiques. La validation repose sur l'exactitude, un paramètre qui intègre les notions de fidélité et de justesse. Les profils d'exactitude ont été construits pour chaque analyte à l'aide de contrôles qualité. La conformité des résultats obtenus par la méthode analytique est déterminée à l'aide du logiciel NeoLicy®. La performance de la méthode (exactitude) tient compte de l'adéquation des résultats expérimentaux avec les limites d'acceptabilité fixées. Elles sont définies de sorte à garantir que les mesures obtenues par la méthode soient suffisamment proches de la valeur vraie avec un risque associé (α). La conformité des résultats expérimentaux tient compte de l'intervalle de tolérance, comportant

plusieurs niveaux de concentration. Pour chaque niveau de concentration, la fidélité (la dispersion des mesures entre elles) et la justesse (l'écart de la moyenne des mesures à la valeur vraie) ont été déterminées. L'intervalle de tolérance est obtenu en reliant tous les niveaux de concentration, respectivement pour les limites basses et les limites hautes de dispersion. La représentation graphique du profil d'exactitude est présentée en figure 45.

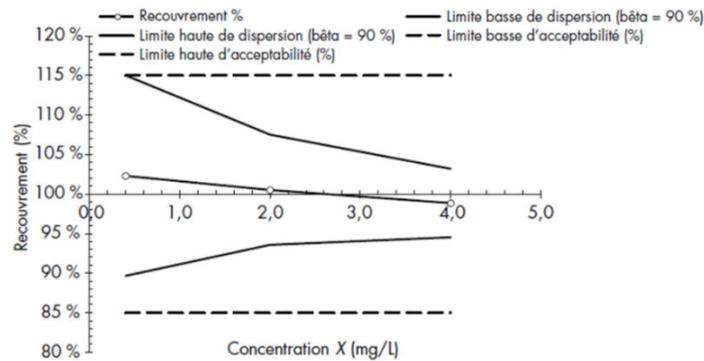


Figure 45 : Illustration du profil d'exactitude
[source : Feinberg, 2015 (271)]

1.2.4.2. Conditions expérimentales pour la validation

Le plan de validation inclut trois séries, avec trois répétitions par série. En raison de l'absence de seuils de référence concernant les teneurs en plastifiants dans les gants, les limites d'acceptabilité β ont été fixées à $\pm 15\%$ avec un risque α de 5% en se basant sur le texte de la SFSTP (270). La procédure de validation a été réalisée à l'aide de courbes d'étalonnage sur trois jours afin de déterminer l'incertitude associée sur les mesures. Chaque jour, six points de gamme et quatre contrôles qualité ont été préparés en triplicats et ont été injectés. Toutes les solutions ont été préparées par dilutions des solutions de travail dans l'acétone (GC-MS) ou dans un mélange ACN/H₂O (50/50, v/v) (HPLC-DAD). En notant que des solutions indépendantes ont été utilisées pour préparer les gammes d'étalonnage et les contrôles qualités.

- En GC-MS, les gammes d'étalonnage et les contrôles qualité de la validation sont détaillés dans le tableau XIV. En notant que le DEP-d4 (étalon interne) a systématiquement été ajouté dans chacune de ces solutions à une concentration finale de 1 mg/l.
- En HPLC-DAD, les gammes d'étalonnage et les contrôles qualité de la validation sont détaillés dans le tableau XV.

La figure 46 récapitule le plan de validation mis en œuvre en GC-MS et HPLC-DAD pour l'approche basée sur le profil d'exactitude.

Tableau XIV : Gammes d'étalonnage et contrôles qualité de la validation en GC-MS

GC-MS					
Analyte	Gamme d'étalonnage (mg/l)	Contrôles qualités (QC, mg/l)			
		QC1	QC2	QC3	QC4
DMP	[0,05-0,5]	0,06	0,15	0,35	0,5
DEP	[0,05-0,5]	0,06	0,15	0,35	0,5
DPP	[0,05-0,5]	0,06	0,15	0,35	0,5
DIBP	[0,05-0,5]	0,06	0,15	0,35	0,5
DBP	[0,05-0,5]	0,06	0,15	0,35	0,5
DphP	[0,05-0,5]	0,06	0,15	0,35	0,5
BBP	[0,5-6]	0,75	2,5	4,5	6
DEHP	[0,3-3]	0,4	1,25	2,25	3
DEHT	[0,3-3]	0,4	1,25	2,25	3
DINP	[15-135]	15	45	90	120
TOTM	[5-60]	7,5	25	45	60

Tableau XV : Gammes d'étalonnage et contrôles qualité de la validation en HPLC-DAD

HPLC-DAD					
Analyte	Gamme d'étalonnage (mg/l)	Contrôles qualités (QC, mg/l)			
		QC1	QC2	QC3	QC4
DMP	[0,05-1]	0,15	0,35	0,5	1
DEP	[0,05-1]	0,15	0,35	0,5	1
DPP	[0,05-1]	0,15	0,35	0,5	1
DphP	[0,05-1]	0,15	0,35	0,5	1
BBP	[0,05-1]	0,15	0,35	0,5	1
DBP	[0,05-1]	0,15	0,35	0,5	1
DCHP	[0,05-1]	0,15	0,35	0,5	1
DEHP	[0,05-1]	0,15	0,35	0,5	1
DEHT	[0,05-1]	0,15	0,35	0,5	1
DNOP	[0,05-1]	0,15	0,35	0,5	1
TOTM	[0,05-1]	0,15	0,35	0,5	1
DIBP	[0,05-1]	0,15	0,35	0,5	1
DINP	[0,5-10]	1,5	3,5	5	10

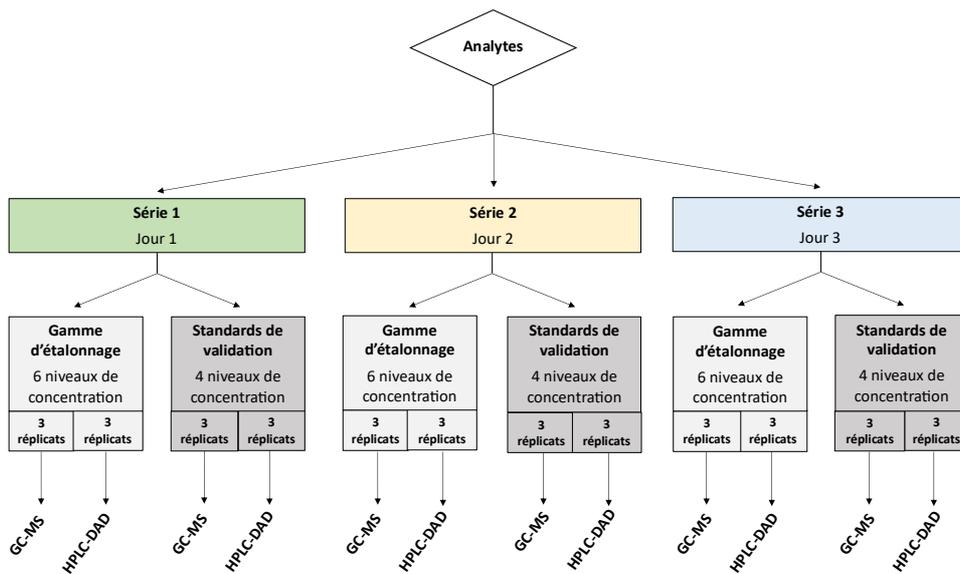


Figure 46 : Schéma représentant le plan de validation mis en œuvre

2. Partie expérimentale en biologie cellulaire

2.1. Matériels

2.1.1. Modèle cellulaire

Les cellules endothéliales microvasculaires issues du derme humain (HMEC-1) proviennent de l'American Type Culture Collection (référence ATCC® CRL-3243™). L'ampoule cellulaire qui a été reçue correspond à un passage 22. C'est une lignée cellulaire issue du prépuce de derme humain, qui a été immortalisée par transfection du virus simien 40 (SV40). Les cellules ont été cultivées sous une atmosphère humide, dans un incubateur thermostaté à 37°C et avec 5% de CO₂. Les cellules ont été manipulées sous un poste de sécurité microbiologique.

2.1.2. Milieu de culture, réactifs et solvants

Le diméthylsulfoxyde (DMSO, CAS : 67-68-5) provient de Sigma-Aldrich (Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France). Le méthanol de qualité HPLC, l'hydroxyde de sodium (CAS : 1310-73-2) et l'acide chlorhydrique (CAS : 7647-01-0) ont pour fournisseur VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

- Pour l'entretien cellulaire, le milieu de culture MCDB-131 (1X), le sérum de veau fœtal (SVF), la L-glutamine (200 mM), le facteur de croissance épidermique recombinant humain, le mélange de pénicilline et de streptomycine (10 000 U/ml et 10 000 µg/ml), le tampon phosphate salin (D-PBS, 10X), la trypsine-EDTA (0,05%) proviennent de Gibco (Fisher Scientific, Illkirch, France). L'hydrocortisone (CAS : 50-23-7), le bleu trypan (CAS : 72-57-1) ont pour fournisseur Sigma-Aldrich (Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France).

- Pour la mesure de la viabilité cellulaire, les réactifs utilisés sont le sel de tétrazolium (MTT, CAS : 298-93-1) et le sodium dodécylsulfate (SDS, CAS : 151-21-3), qui ont pour fournisseur Sigma-Aldrich (Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France).

- Pour l'extraction des cellules, l'acide perchlorique de Prolabo (70%, VWR, Fontenay-sous-Bois, France, CAS 7601-90-3) et le carbonate de potassium (CAS : 584-08-7) proviennent de Sigma-Aldrich (Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France).

- Pour le dosage du glutathion total intracellulaire, le dihydrogénophosphate de sodium (CAS : 7558-80-7), l'acide 5,5'-dithiobis-(2-acide nitrobenzoïque) (CAS : 69-78-3), la glutathion réductase (8,5 U/ml), la forme réduite du L-glutathion (GSH, CAS : 70-18-8) proviennent de Sigma-Aldrich (Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France). L'acide éthylènediaminetétracétique

(EDTA) provient de Prolabo (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Le sel tétrasodique hydrate de β -Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) est issu de Roche (Mannheim, Allemagne).

- Pour le dosage des adénosines phosphates intracellulaires, l'adénosine triphosphate (ATP, sel dihydraté, CAS : 34369-07-8), l'adénosine diphosphate (ADP, sel monohydraté, CAS : 20398-34-9), l'adénosine monophosphate (AMP, sel monohydraté, CAS : 149022-20-8) et l'hydrogénophosphate de potassium (CAS : 7758-11-4) proviennent de Sigma-Aldrich (Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France). L'eau ultrapure (18,2 M Ω .cm) est produite par le système de purification d'eau Elga (Veolia).

- Pour les dosages des protéines cellulaires, le carbonate de sodium (CAS : 497-19-8), le sulfate de cuivre (CAS : 7758-99-8), le réactif de Folin-Ciocalteu (2N) et l'albumine sérique bovine (CAS : 9048-46-8) proviennent de Sigma-Aldrich (Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France). Le tartrate de sodium et de potassium est fourni par Carlo-Erba (Val-de-Reuil, France). Le réactif de Bradford provient de Bio-Rad (Hercules, États-Unis).

- Pour l'évaluation de la fonction mitochondriale, le milieu XF DMEM (pH 7,4), le glucose (1,0 M), le pyruvate (100 mM), la L-glutamine (200 mM) proviennent d'Agilent Technologies (Agilent Technologies France, Les Ulis, France). Les inhibiteurs de la chaîne respiratoire à savoir l'antimycine A (CAS : 1397-94-0), la FCCP (en anglais pour « *Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone* », CAS : 370-86-5), l'oligomycine A (CAS : 579-13-5) et la roténone (CAS : 83-79-4) proviennent de Sigma-Aldrich (Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France).

2.1.3. Consommables

Les flasques (25 cm² et 75 cm²), les plaques (6 puits et 96 puits), les tubes (15 ml et 50 ml), les pipettes sérologiques (5 ml, 10 ml, 25 ml et 50 ml) ainsi que les grattoirs de cellules proviennent de BD Falcon (Corning, États-Unis). Les plaques 24 puits XF24 V7 pour les expérimentations de la fonction mitochondriale proviennent d'Agilent Technologies (Agilent Technologies France, Les Ulis, France). Pour le traitement des cellules, les cônes Eppendorf LoRetention (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) ont été utilisés. Les filtres seringues (en polyamide nylon) utilisés proviennent de Macherey-Nagel (Düren, Allemagne).

2.1.4. Appareillages

Le PSM, l'incubateur et le microscope optique ont pour fournisseur respectivement Haier Biomedical (Sunbury-on-Thames, Royaume-Uni), PHC Europe (Etten-Leur, Pays-Bas) et Leica (Nanterre, France). La centrifugeuse provient d'Eppendorf (Hambourg, Allemagne) et le bain-marie de Labnet (Corning, États-Unis). Le lecteur de microplaques SAFAS Xenius (SAFAS Monaco, Monaco) a été utilisé pour les lectures d'absorbance pour la mesure de la viabilité (test MTT) et des protéines (méthode de Lowry), et un lecteur de microplaque Tecan Spark® (Männedorf, Suisse) a été utilisé pour la cinétique de dosage du glutathion total. Le lecteur de microplaques CLARIOstar Plus (BMG LabTech, Champigny-sur-Marne, France) a été utilisé pour les lectures d'absorbance pour les protéines (méthode Bradford). Le système HPLC-DAD *Agilent 1260 Infinity HPLC system* (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, États-Unis) a été utilisé pour le dosage des adénosines phosphates cellulaires. Le système HPLC-DAD est équipé d'un échantillonneur automatique, d'une pompe quaternaire et d'un détecteur DAD. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Poroshell 120 EC-C18 (150 mm x 3 mm, 2,7 µm, Agilent) équipée en amont d'une précolonne EC-C18 (3 mm, Agilent). Le traitement des données a été réalisé grâce à l'interface OpenLab CDS LC ChemStation (Agilent). L'analyseur Seahorse XF24 Extracellular Flux (Agilent Technologies, les Ulis, France) a été utilisé pour évaluer la fonction mitochondriale et l'analyse des données a été réalisée avec le logiciel Wave Software (Version 2.6.3.5, Agilent Technologies).

2.2. Méthodes

2.2.1. Plastifiants étudiés

Trois plastifiants ont été sélectionnés dans le cadre des études menées *in vitro* pour évaluer la toxicité endothéliale des plastifiants : il s'agit du DEHP, du DEHT et du DINP. Ils ont été étudiés individuellement (chacun à une concentration de 15 mg/l) et en mélange (solution composée des trois plastifiants, chacun étant ajouté à une concentration de 15 mg/l).

2.2.2. Préparation des solutions de plastifiants

Pour chaque plastifiant, les solutions mères ont été préparées par gravimétrie à une concentration de 10 g/l dans du DMSO. Des solutions intermédiaires ont été préparées dans le DMSO pour les plastifiants individuellement et en mélange (chaque plastifiant étant à une concentration de 1 500 mg/l). Toutes les solutions ont été conservées à 4°C à l'abri de la

lumière. Les solutions de travail ont été préparées extemporanément par dilution des solutions intermédiaires dans le milieu de culture supplémenté à une concentration commune de 15 mg/l pour chaque condition (concentration finale de DMSO à 1%). Lors des expositions cellulaires, une solution contenant du milieu de culture complet avec 1% de DMSO a été préparée et correspond au contrôle solvant.

2.2.3. Conditions de culture cellulaire

2.2.3.1. Préparation du milieu de culture

Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture MCDB-131 (1X) qui a été supplémenté en suivant les recommandations du fournisseur (272). Le milieu de culture supplémenté contient 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (65°C, 1h), 10 mmol/l de L-glutamine, 1 µg/ml d'hydrocortisone, 10 ng/ml de facteur de croissance épidermique recombinant humain, et un mélange de streptomycine et de pénicilline respectivement à 10 UI/ml et à 10 µg/ml. Le milieu de culture ainsi préparé a été conservé à 4°C pour son stockage.

2.2.3.2. Entretien cellulaire

Les cellules utilisées dans le cadre de ce travail sont comprises entre le passage 32 et 40. Le milieu de culture a préalablement été chauffé à 37°C avant d'être utilisé pour la culture cellulaire. Les cellules ont été cultivées dans des flasques de 25 cm² (soit environ 40 000 cellules/cm²) et de 75 cm² (soit environ 30 000 cellules/cm²) pour les amplifier. Les cellules HMEC observées au microscope optique sont représentées par la figure 47.

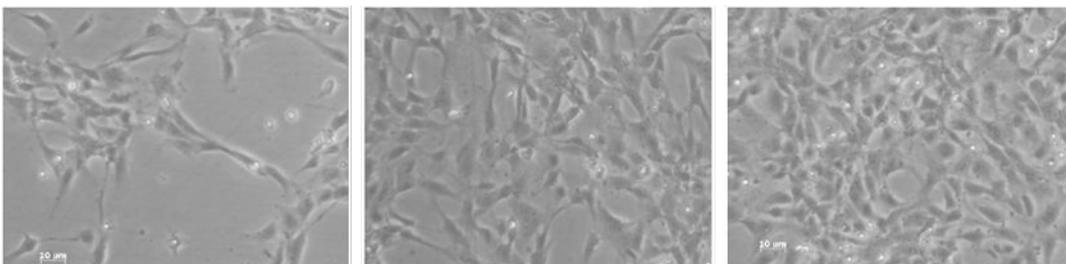


Figure 47 : Cellules HMEC-1 observées dans les flasques de culture à différents stades au microscope optique (objectif x10)

Le passage des cellules a été effectué lorsqu'elles ont atteint la quasi-confluence (entre 80 et 90% de confluence) dans la flasque. Le milieu de culture présent dans la flasque a été aspiré et le tapis cellulaire a été rincé par du D-PBS (1X) afin d'éliminer les cellules flottantes et les débris cellulaires. Puis le D-PBS a été aspiré et la flasque a ensuite été incubée pendant 5 à 10

minutes avec de la trypsine-EDTA (0,05%) pour décoller les cellules du support par hydrolyse des liaisons peptidiques. L'action de la trypsine a été neutralisée par le MDCB-131 supplémenté. La suspension cellulaire a été récupérée et centrifugée à une force centrifuge (rcf) de 200 pendant 10 minutes. Le surnageant a été aspiré et le culot cellulaire a été repris dans du milieu MCDB-131 supplémenté pour effectuer une numération cellulaire. Le comptage a été effectué sur une cellule de Malassez par dilution au demi de la suspension cellulaire dans le bleu trypan (0,1%), qui est un colorant d'exclusion.

2.2.4. Protocole pour évaluer *in vitro* la toxicité endothéliale des plastifiants

Les cellules ont été exposées aux plastifiants (individuellement et mélange) à une concentration de 15 mg/l (1% DMSO). La concentration testée a été choisie en s'appuyant sur des études toxicologiques ayant évalué la toxicité cardiovasculaire des plastifiants (236,246). La solubilité des plastifiants dans le milieu de culture (solutions individuelles et solution mélange) a été vérifiée par turbidimétrie. La figure 48 illustre les méthodologies mises en œuvre pour évaluer la toxicité endothéliale des plastifiants.

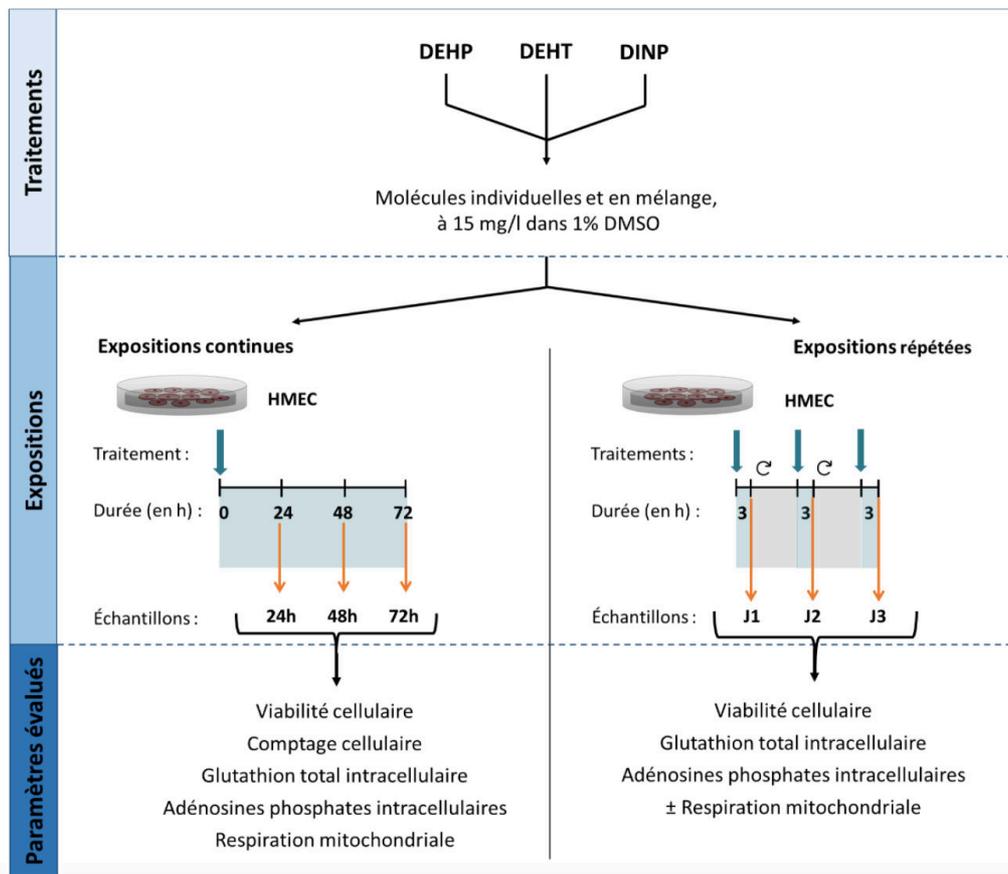


Figure 48 : Approches méthodologiques pour évaluer *in vitro* la toxicité endothéliale des plastifiants

Les expositions ont été réalisées de manière continue ou de manière répétée à la suite desquelles les paramètres suivants ont été étudiés : la viabilité cellulaire, le glutathion intracellulaire total, les adénosines phosphates intracellulaires et la respiration mitochondriale. Pour les expositions continues, les cellules ont été exposées aux plastifiants sans interruption et sans changement de milieu. Pour les expositions répétées, les cellules ont été traitées de manière discontinue (trois heures par jour) en changeant le milieu entre chaque exposition ; il s'agit de la période de récupération durant laquelle les cellules ne sont plus exposées aux molécules. Pour les deux protocoles, un effet temps a été réalisé pour évaluer les effets cellulaires des plastifiants. Pour les expositions continues, les temps 24, 48 et 72 heures ont été réalisés et pour les expositions répétées, un temps de 3h/jour pendant 3 jours consécutifs a été choisi. Pour chaque étude, au moins quatre expériences indépendantes ont été réalisées.

2.2.5. Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été déterminée par le test MTT (en anglais pour « Methyl thiazolyl tetrazolium », plus communément appelé sel de tétrazolium). Les cellules métaboliquement viables réduisent le sel de tétrazolium en formazan (couleur bleu-violet). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de cellules métaboliquement viables.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules (soit environ 60 000 cellules/cm²). Une plaque a été préparée pour chaque temps d'exposition. Les plaques ont été placées dans l'incubateur (37°C, 5% de CO₂) afin de permettre l'adhésion et la prolifération des cellules jusqu'au jour du traitement (à quasi-confluence, soit 72 heures après l'ensemencement). Le jour du traitement, le milieu de culture a été aspiré puis a été remplacé par 100 µl des solutions de travail (DEHP, DEHT, DINP, ou mélange). Des contrôles ont été ajoutés pour valider le test lors de chaque expérience : contrôle culture (milieu MCDB-131 supplémenté dit milieu complet), contrôle solvant (DMSO 1%) et contrôle de mortalité (milieu MCDB-131 non supplémenté). Une colonne de puits sans cellules avec du milieu complet a été conservée afin d'effectuer la mesure du blanc sans cellules. À la fin de chaque durée d'exposition, un volume de 10 µl d'une solution de MTT (solution à 5 mg/ml dans du PBS, soit une concentration finale de 0,5 mg/ml) a été ajouté dans chaque puits. Après trois heures d'incubation à l'abri de la lumière, un volume de 100 µl d'une solution de SDS (préparée à 10% dans 0,01N d'acide chlorhydrique) a été ajouté dans chaque puits pour réduire les cristaux de formazan formés. La plaque a ensuite été incubée durant la nuit à l'abri de la lumière et la lecture d'absorbance a été effectuée le lendemain à une longueur d'onde de 570 nm. Pour

chaque condition testée, la moyenne des absorbances de l'ensemble des puits d'une même condition a été calculée. La viabilité cellulaire est calculée comme suit :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\text{Absorbance éch. traité} - \text{Absorbance blanc } \emptyset \text{ } \text{€}}{\text{Absorbance éch. non traité} - \text{Absorbance blanc } \emptyset \text{ } \text{€}} * 100$$

Avec : *Absorbance éch. traité* : moyenne des absorbances pour le traitement (avec cellules) ;
Absorbance éch. non traité : moyenne des absorbances pour le contrôle solvant (avec cellules) ;
Absorbance blanc \emptyset € : moyenne des absorbances pour le blanc (sans cellules).

Les résultats de viabilité cellulaire sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle solvant (DMSO 1%) pour analyser l'effet des plastifiants, en notant que la viabilité du contrôle solvant a été standardisée à 100% en vue de l'analyse statistique avec GraphPad Prism.

2.2.6. Dosage du glutathion et des adénosines phosphates

2.2.6.1. Préparation des échantillons

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 450 000 cellules par puits (soit environ 50 000 cellules/cm²). Une plaque a été préparée pour chaque temps d'exposition (expositions continues et répétées). À l'issue des expositions, les cellules ont été extraites à froid en utilisant de l'acide perchlorique (HClO₄, PCA, 1N), en détachant les cellules à l'aide d'un grattoir de cellules. Le protocole de l'extraction cellulaire par l'acide perchlorique est détaillé en figure 49.

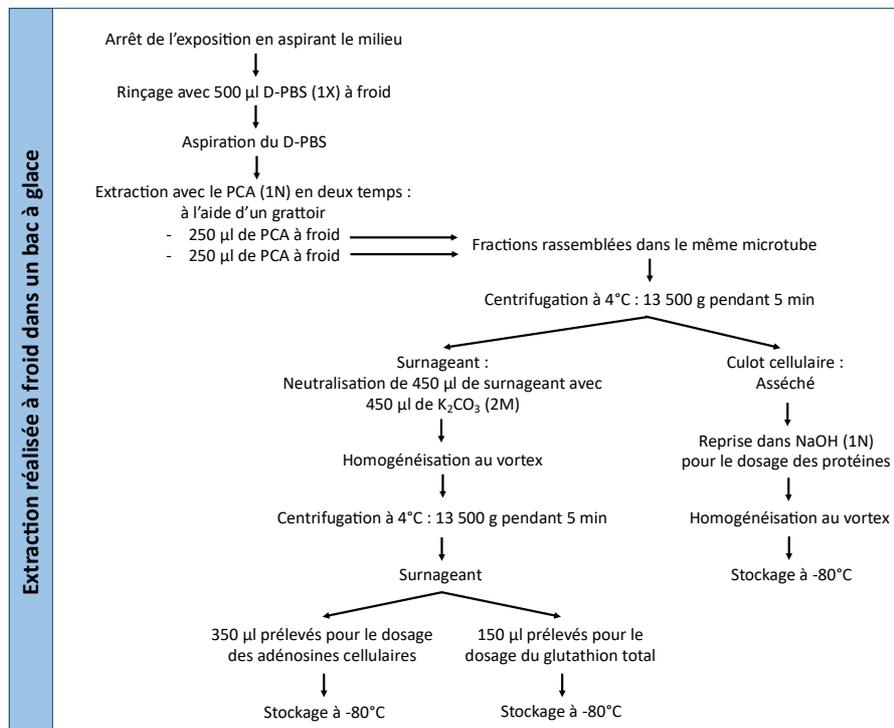


Figure 49 : Protocole de l'extraction cellulaire (glutathion total intracellulaire et adénosines phosphates intracellulaires) par l'acide perchlorique en plaque 6 puits

À la suite d'une première étape de centrifugation, le surnageant a été séparé du culot protéique. Le culot protéique a été asséché et solubilisé dans une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH 1N). Puis lors d'une deuxième étape de centrifugation, le surnageant a été divisé en deux fractions, respectivement pour le dosage du glutathion total intracellulaire et pour le dosage des adénosines phosphates intracellulaires. Tous les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'au moment de leur dosage.

2.2.6.2. Dosage du glutathion total intracellulaire

Le dosage a été réalisé par colorimétrie sur la fraction de surnageant cellulaire récoltée au cours de l'étape d'extraction cellulaire. C'est une méthode indirecte reposant sur la mesure du TNB (acide 5-mercapto-2-nitrobenzoïque) formé à la suite de la réaction entre le glutathion réduit (GSH) et le DTNB (acide 5,5'-dithiobis-(2-acide nitrobenzoïque)) (Figure 50) (273).

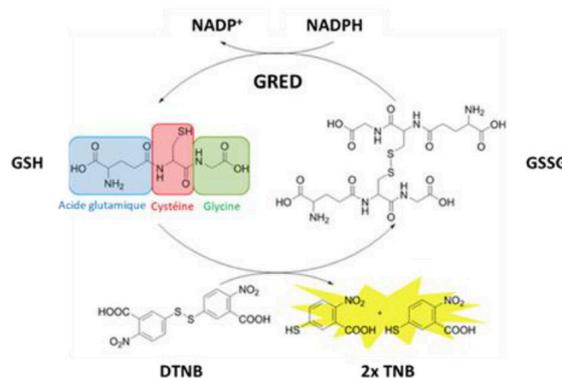


Figure 50 : Principe du dosage de glutathion total intracellulaire par spectrophotométrie [d'après Ortega-Higueruelo et Langa, 2018 (274)]

Le dosage a été réalisé dans une microplaque 96 puits. En parallèle du dosage des échantillons, une gamme d'étalonnage a été préparée à partir d'une solution étalon de glutathion réduit (GSH, 4 mM) dans une solution de tampon phosphate (NaH_2PO_4 à 143 mM et EDTA à 6,31 mM, pH 7,4). La réaction a été initiée par l'ajout de 200 μl de solution réactive contenant le DTNB à 0,31 mg/ml et le NADPH à 0,23 mg/ml puis la glutathion réductase (GRED, 8,5 U/ml) a été ajoutée rapidement dans chaque puits. L'absorbance du TNB produit est corrélée à la quantité de glutathion total intracellulaire de l'échantillon, elle a été mesurée à 405 nm pendant 2 minutes 40 (5 mesures/puits). La gamme et les échantillons ont été dosés en parallèle sur la même plaque et ont été réalisés en triplicat sur quatre expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en nmol/mg de protéines (cf Matériels et méthodes, § 2.2.6.4. Dosage des protéines par la méthode de Lowry). Ces résultats ont ensuite été standardisés par rapport au contrôle solvant du jour (DMSO 1%) en vue de leur analyse statistique avec GraphPad Prism.

2.2.6.3. Dosage des adénosines phosphates intracellulaires

Le dosage des adénosines phosphates cellulaires a été effectué en quantifiant l'ATP, l'ADP et l'AMP. Il a été réalisé sur la fraction de surnageant cellulaire récoltée au cours de l'étape d'extraction cellulaire. Les concentrations des adénosines phosphates cellulaires ont été mesurées par HPLC-DAD, en utilisant une méthode d'analyse simultanée (ATP, ADP et AMP) qui a précédemment été développée et validée au sein du laboratoire sur deux autres modèles cellulaires (275). Les paramètres de validation sont détaillés dans l'annexe V. Avant leur analyse, les extraits ont été filtrés à l'aide d'un filtre seringue (en polyamide nylon, diamètre de 25 mm et porosité de 0,45 μm). Un volume de 1 μl a été injecté pour chaque extrait. La séparation des adénosines phosphates a été réalisée avec un débit de 0,6 ml/min en mode isocratique avec une phase mobile aqueuse (50 mM d'hydrogénophosphate de potassium, pH 6,8). La détection des trois adénosines phosphates a été effectuée à une longueur d'onde de 254 nm. Pour chaque condition testée, la moyenne des triplicats a été calculée. Au total, au moins quatre expériences indépendantes ont été réalisées. Chaque concentration a été normalisée avec la quantité de protéines de l'échantillon correspondant, exprimée en nmol/mg de protéines (cf Matériels et méthodes, § 2.2.6.4. Dosage des protéines par la méthode de Lowry). Pour chaque condition d'exposition, les résultats sont exprimés sous la forme du rapport de concentrations ATP/ADP en les standardisant au contrôle solvant du jour (DMSO 1%) en vue de l'analyse statistique avec GraphPad Prism.

2.2.6.4. Dosage des protéines par la méthode de Lowry

Le dosage des protéines a été réalisé par colorimétrie selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) (276). C'est une méthode de dosage indirecte dont la mesure repose sur le changement de coloration lié à la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu, par couplage de la réaction de Biuret et de la réaction de Folin-Ciocalteu (Figure 51).

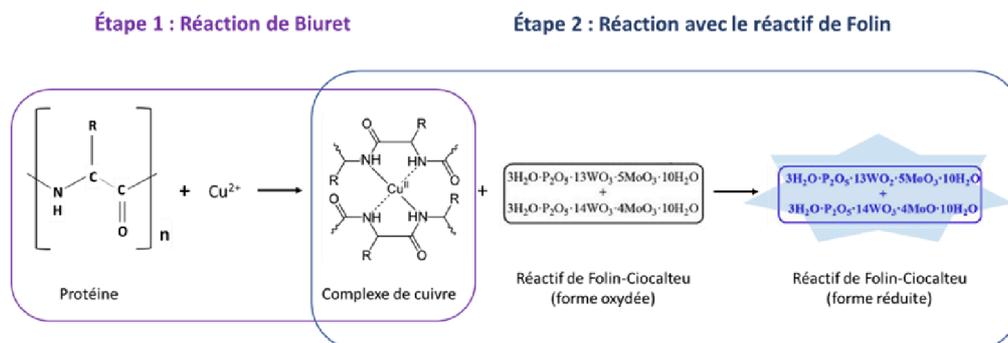


Figure 51 : Principe du dosage des protéines par la méthode de Lowry [adapté de Martínez *et al.*, 2020 (277)]

Le dosage des protéines a été réalisé en microplaque 96 puits sur les culots cellulaires solubilisés dans le NaOH 1N. En parallèle du dosage des échantillons, une gamme d'étalonnage a été préparée à partir d'une solution mère d'albumine sérique bovine (BSA, 20 mg/ml) dans le NaOH. La réaction a été initiée par l'ajout, aux échantillons et à la gamme, de 200 µl d'une solution de carbonate de sodium à 188 mM, de tartrate de sodium et de potassium à 0,71 mM et de sulfate de cuivre à 25,1 mM. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, un volume de 20 µl d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu (2N) diluée au demi a été ajoutée et mélangée dans chaque puits, en le laissant réagir pendant 30 minutes à température ambiante. La mesure d'absorbance a ensuite été effectuée à 650 nm.

2.2.7. Évaluation de la fonction mitochondriale

La mitochondrie contribue à la production d'énergie cellulaire. L'ATP est produite par la phosphorylation oxydative par couplage de la chaîne respiratoire mitochondriale et de l'ATP synthase, localisées au niveau de la membrane interne mitochondriale. Le taux de consommation en oxygène (OCR en anglais pour « Oxygen consumption rate ») et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR en anglais pour « Extracellular acidification rate ») ont été mesurés en utilisant des inhibiteurs des complexes de la chaîne respiratoire selon le protocole MitoStress Test du Seahorse (Agilent Technologies) tel que décrit ci-après. Pour évaluer la fonction mitochondriale, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits 96 heures avant les mesures. Une étude de densité cellulaire a été initialement réalisée, entre 15 000 et 35 000 cellules par puits, ayant permis de choisir la densité de 25 000 cellules par puits. Les traitements ont été réalisés sur une même plaque pour les différentes conditions testées (DEHP, DEHT, DINP, mélange, contrôle solvant). À la fin des expositions, correspondant au jour des mesures, les cellules ont été rincées avec 1 ml de milieu DMEM XF (sans rouge phénol) supplémenté avec 10 mM glucose, 1mM pyruvate et 2 mM L-glutamine (pH 7,4). Elles ont ensuite été incubées une heure à 37°C, dans un incubateur sans CO₂. À l'issue de cette incubation, la respiration basale a été mesurée (3 cycles, 24 minutes) puis, les inhibiteurs des complexes de la chaîne respiratoire ont été ajoutés successivement dans chaque puits suivis de trois cycles de 24 minutes de lecture après chaque injection (soit trois mesures par condition) : l'oligomycine A (8 µg/ml) inhibant l'ATP synthase, le FCCP (1 µM) entraînant la fuite des protons dans l'espace intermembranaire, et un mélange d'antimycine A (2 µg/ml) et de roténone (5 µM) inhibant le transport des électrons respectivement au niveau du complexe III et du complexe I. En notant qu'à la fin de l'expérience, les cellules ont été récupérées en vue de l'extraction des protéines par la méthode de Bradford (cf Matériels et méthodes, § 2.2.8.

Dosage des protéines par la méthode Bradford). Pour chaque condition testée, la moyenne de triplicats a été calculée. Au total, au moins trois expériences indépendantes ont été réalisées.

2.2.8. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines (échantillons issus de l'étude de la fonction mitochondriale) a été réalisée par colorimétrie selon la méthode de Bradford (278). C'est une méthode de dosage indirecte reposant sur le changement de coloration du réactif de Bradford lorsqu'il se lie aux protéines. Le dosage des protéines a été réalisé en microplaque 96 puits. À la fin de l'étude de la fonction mitochondriale, les cellules ont été asséchées puis solubilisées dans 50 µl de NaOH (1N). Les extraits cellulaires ont ensuite été congelés à -20°C jusqu'au moment de leur dosage. En parallèle du dosage des échantillons, une gamme d'étalonnage a été préparée à partir d'une solution mère de réactif de Bradford (20 mg/ml). La mesure d'absorbance a été réalisée à 595 nm.

2.2.9. Analyses statistiques

Pour tous les résultats (viabilité cellulaire, glutathion total intracellulaire, adénosines phosphates cellulaires et fonction mitochondriale), les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism (version 9.3.0). Le test non paramétrique de Mann-Whitney (échantillons non appariés) a été appliqué pour toutes les analyses statistiques car la distribution des échantillons ne suit pas une loi normale. Les résultats analysés sont exprimés sous la forme suivante : moyenne ± écart-type. Lors de l'analyse statistique, les conditions ont été comparées deux à deux. Les résultats avec une $p < 0,05$ sont considérés comme étant statistiquement significatifs.

RÉSULTATS

Article 1

Analysis of Phthalates and Alternative Plasticizers in Gloves by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Liquid Chromatography–UV Detection: A Comparative Study

Kelly Poitou ¹, Tiphaine Rogez-Florent ^{1,*}, Marie Lecoœur ^{2,†}, Cécile Danel ², Romain Regnault ², Philippe Vérité ¹, Christelle Monteil ^{1,‡} and Catherine Foulon ^{2,‡}

¹ Normandie Univ UNIROUEN, UNICAEN, ABTE, 76000 Rouen, France; kelly.poitou1@univ-rouen.fr (K.P.); philippe.verite@univ-rouen.fr (P.V.); christelle.monteil@univ-rouen.fr (C.M.)

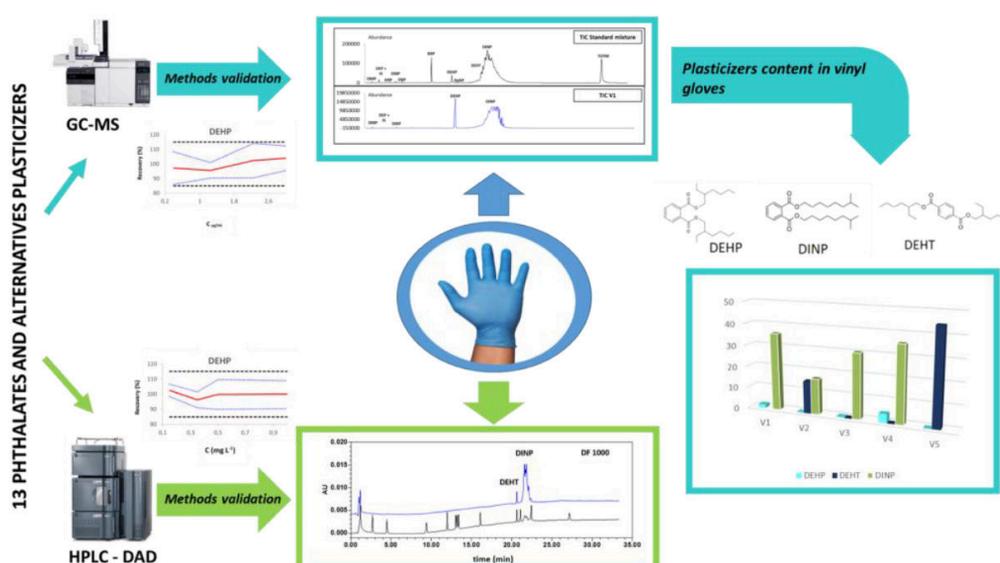
² Univ. Lille, CHU Lille, ULR 7365-GRITA-Groupe de Recherche sur les formes Injectables et Technologies Associées, 59000 Lille, France; marie.lecoeur@univ-lille.fr (M.L.); cecile.danel@univ-lille.fr (C.D.); romain.regnault@univ-lille.fr (R.R.); catherine.foulon@univ-lille.fr (C.F.)

* Correspondence: tiphaine.rogez@univ-rouen.fr; Tel.: +33-235-148-568

† Co-second authors.

‡ Co-last authors.

Graphical abstract



Contexte

Les gants à usage professionnel constituent un équipement indispensable en milieu professionnel concernant la protection des mains afin de répondre aux exigences en matière d'hygiène et de bonnes pratiques de laboratoire. Malgré leur usage répandu dans la sphère professionnelle, les informations disponibles concernant la composition des gants sont limitées. C'est notamment le cas des plastifiants, une catégorie de substances chimiques pointées du doigt car certaines sont connues comme étant toxiques pour l'Homme. Dans ce cadre, l'objectif de cette étude a été de développer et valider deux méthodes analytiques orthogonales, respectivement la GC-MS et l'HPLC-DAD, pour pouvoir caractériser les plastifiants dans les gants. Dans un deuxième temps, ces méthodes ont été appliquées pour déterminer la composition en plastifiants sur un échantillonnage de gants représentatif du marché actuel, incluant différentes catégories de gants (latex, nitrile, néoprène et vinyle).

Principaux résultats

Dans le cadre de cette étude, treize plastifiants ont été étudiés, incluant onze phtalates (BBP, DBP, DCHP, DEHP, DEP, DIBP, DINP, DMP, DNOP, DphP et DPP) et deux plastifiants non phtalates (DEHT et TOTM). Ils ont été sélectionnés en se basant sur l'état de l'art et d'après les résultats expérimentaux obtenus à la suite de premiers essais réalisés sur des extraits des gants. Les deux méthodes analytiques (GC-MS et HPLC-DAD) ont été optimisées pour l'analyse simultanée de ces treize analytes d'intérêt pour une application en routine. Les optimisations ont été menées sur des colonnes à polarité de phase inverse, 5% phényle/95% méthyl polysiloxane en GC et C18 en HPLC. Les résultats ont montré que l'HPLC-DAD est plus résolutive avec la séparation des treize plastifiants en 35 minutes alors que l'optimisation en GC-MS a permis de séparer onze plastifiants en 35 minutes. Toutefois, la possibilité de travailler en mode SIM en GC-MS a permis de résoudre les problèmes de coélutions rencontrés, comme par exemple lors de la coélution entre le DEHT (m/z 112,1) et le DINP (m/z 293,1). À la suite des optimisations, les deux méthodes ont été validées puis comparées. Sachant que la composition en plastifiants n'est pas connue dans les gants, l'enjeu de la validation a consisté à quantifier les plastifiants en couvrant une large gamme de concentrations. L'approche de validation basée sur le profil d'exactitude a été choisie pour cette étude. Les méthodes ont été validées avec une procédure réalisée sur trois jours et avec une erreur totale de $\pm 15\%$. Les limites de quantification obtenues sont comprises entre 0,02 et 40,14 $\mu\text{g/ml}$ en GC-MS, et entre 0,05 et 0,5 $\mu\text{g/ml}$ en HPLC-DAD.

Les méthodes ont ensuite été appliquées pour caractériser les plastifiants dans un échantillonnage de dix gants, incluant des gants en latex, nitrile, néoprène et vinyle. Préalablement, les plastifiants ont été extraits par l'acétone (30 minutes d'ultrasons, à température ambiante). Au total, sept plastifiants (DMP, DEP, DIBP, DBP, DEHP, DEHT et DINP) ont été caractérisés sur l'ensemble de l'échantillonnage de gants parmi les treize plastifiants d'intérêt. Et la GC-MS a permis d'obtenir des résultats plus exhaustifs. De manière générale, les teneurs quantifiées sont très variables entre les plastifiants, avec la mise en évidence de trois plastifiants majoritaires (DEHP, DEHT et DINP). De plus, les résultats ont montré de grandes disparités en teneurs sur l'ensemble de l'échantillonnage, s'échelonnant de 0,0005 jusqu'à 44% (m/m), en notant que les teneurs les plus importantes ont été quantifiées dans les échantillons de gants en vinyle. Cette étude a permis de montrer la complémentarité de deux techniques d'analyse (GC-MS et HPLC-DAD) pour la caractérisation des plastifiants entrant dans la composition des gants. Malgré les limites de détection et de quantification plus élevées obtenus par GC-MS comparativement à l'HPLC-DAD, la GC-MS présente l'avantage de pouvoir quantifier les plastifiants minoritaires car elle nécessite une dilution moins importante des extraits de gants avant leur analyse.

Conclusion

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont permis de mettre en évidence une variabilité de la composition en plastifiants dans les gants en fonction leur catégorie (latex, nitrile, néoprène et vinyle). Conformément à ce qui était attendu, les résultats ont montré un recours prédominant des plastifiants dans les gants en vinyle. Pour ces derniers, les teneurs quantifiées soulèvent des inquiétudes pour les professionnels concernés. Alors que le DEHP est une substance classée en raison de sa toxicité présumée pour la reproduction humaine, il a néanmoins été quantifié dans tous les échantillons. Les résultats de cette étude soulignent que le port de gant contre le risque chimique constitue une source d'exposition aux plastifiants, notamment aux phtalates. Les résultats apportés par cette étude peuvent s'inscrire dans une démarche plus large visant à réduire l'exposition humaine aux plastifiants, car ils peuvent guider le choix des gants en fonction de leurs teneurs en plastifiants.

Article

Analysis of Phthalates and Alternative Plasticizers in Gloves by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Liquid Chromatography–UV Detection: A Comparative Study

Kelly Poitou¹, Tiphaine Rogez-Florent^{1,*;†}, Marie Lecoeur^{2,‡}, Cécile Danel², Romain Regnault², Philippe Vérité¹, Christelle Monteil^{1,‡} and Catherine Foulon^{2,‡}

¹ Normandie University UNIROUEN, UNICAEN, ABTE, 76000 Rouen, France; kelly.poitou1@univ-rouen.fr (K.P.); philippe.verite@univ-rouen.fr (P.V.); christelle.monteil@univ-rouen.fr (C.M.)

² University Lille, CHU Lille, ULR 7365 - GRITA - Groupe de Recherche sur les formes Injectables et Technologies Associées, F-59000 Lille, France; marie.lecoeur@univ-lille.fr (M.L.); cecile.danel@univ-lille.fr (C.D.); romain.regnault@univ-lille.fr (R.R.); catherine.foulon@univ-lille.fr (C.F.)

* Correspondence: tiphaine.rogez@univ-rouen.fr; Tel.: +33-235-148-568

† Co-second authors.

‡ Co-last authors.

Citation: Poitou, K.; Rogez-Florent, T.; Lecoeur, M.; Danel, C.; Regnault, R.; Vérité, P.; Monteil, C.; Foulon, C. Analysis of Phthalates and Alternative Plasticizers in Gloves by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Liquid Chromatography–UV Detection: A Comparative Study. *Toxics* **2021**, *9*, x. <https://doi.org/10.3390/toxics9090000>

Academic Editors: Lidia Caporossi; Maria Marino

Received: 28 July 2021

Accepted: 26 August 2021

Published: date

MDPI's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Gloves represent an essential feature for hand protection because it is a requirement in the professional framework to comply with both hand hygiene standards and the principles of good laboratory practice. Despite their wide use, there is a knowledge gap regarding their composition, including phthalates. The purpose of the present study was to develop two orthogonal methods, GC–MS and HPLC–DAD, for the screening of plasticizers in gloves. Performances of these two methods were compared in terms of ease of use, number of analyzed plasticizers, and sample preparation. The two methods were validated and applied for the identification and quantification of plasticizers in ten gloves made with different materials (vinyl, nitrile, latex, and neoprene). Results revealed the presence of three main ones: DEHP, DEHT, and DINP. Additionally, the contents of plasticizers were extremely variable, depending on the glove material. As expected, the results point out a predominant use of plasticizers in vinyl gloves with an amount that should be of concern. While DEHP is classified as a toxic substance for reproduction 1B, it was, however, quantified in the ten different glove samples studied. This study provides new data regarding the plasticizers' content in protective gloves, which could be useful for risk assessment.

Keywords: phthalates; alternative plasticizers; gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS); liquid chromatography–diode array detector (HPLC–DAD); gloves

1. Introduction

In 2007, a report from the Occupational Safety and Health Administration estimated the number of workers wearing gloves for chemical protection in the United States at 5.8 million [1]. Gloves are

widely used for medical applications (e.g., healthcare, surgery) and other non-medical applications in laboratories and industries. With the extensive use of protective gloves worldwide, the number of end-users is expected to be highly significant. Different types of protective gloves are employed, such as vinyl, latex, neoprene, or nitrile. Beyond these categories, protective gloves can also be classified according to the benefit of their use, i.e., as personal protective equipment (PPE), for protection from hazardous substances, as well as medical devices (MD) in the health sector. For such use, gloves such as vinyl gloves must comply with both PPE and MD regulations. In some applications, plasticizers such as phthalates (PAEs) are added to the polymer in order to confer characteristics of flexibility, softness, durability, and malleability. Among plasticizers identified, some are of great concern because human health effects involving carcinogenicity, endocrine disruption, and fertility impairment have been described [2–4]. Due to their reprotoxic effects, several phthalates are now classified as toxic substances for reproduction 1B according to the European Regulation No 1272/2008 on classification, labeling, and packaging of substances and mixtures including benzyl butyl phthalate (BBP), dibutyl phthalate (DBP), diisobutyl phthalate (DIBP), and bis-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) [5]. Limitations on use with restrictions for toys and childcare articles, food contact plastics as well as medical devices have been decided. These successive regulations on phthalates coupled with rising concern about their human health effects have encouraged the use of alternative plasticizers with lower toxicity (e.g., long-chain phthalates, adipates, terephthalates) [6–8].

To our knowledge, there are few studies evaluating plasticizers in protective gloves despite their widespread use. Most studies on the subject were conducted to evaluate the permeability capability of organic solvents or in regard to the specification limits established for food contact materials [9–11]. These studies have reported the presence of plasticizers, such as BBP, DBP, DIBP, and DEHP. Moreover, Tsumura et al. [12] identified the migration of DEHP and other plasticizers by food contact with PVC gloves during meal preparation in Japan. They have shown that the DEHP level accounted for 21–41% (*w/w*) by mass in the PVC gloves.

As plasticizers are not covalently bound to the polymer matrix, they can be released into the surrounding environment and can affect the human body [13–20]. Among products manufactured with those plasticizers, gloves appear to be an indubitable source of dermal exposure in the workplace. Therefore, studies are needed to identify and quantify which plasticizers are contained in gloves. Hence, it is important to develop efficient analytical tools to determine plasticizers content in gloves. It will provide new elements to establish whether gloves tend to follow the current legislation about plasticizers.

Gas chromatography (GC) coupled with flame ionization (FID) or mass spectrometry (MS) detection and liquid chromatography (LC) coupled with MS or with UV detection have been reported for the analysis of plasticizers in several types of matrices such as cosmetics and medical devices [4,11,13,17,21,22]. GC–MS and liquid chromatography coupled with diode array detector (HPLC–DAD) were chosen because they are orthogonal techniques in terms of separation performance and preparation of samples.

The first aim of this work was to develop and validate two efficient orthogonal methods, i.e., GC–MS and HPLC–DAD, for the simultaneous analysis of the selected plasticizers. The validated methods were then

applied to the identification and quantification of plasticizers in protective gloves after a simple extraction step with an organic solvent. The results obtained with the two developed methods are compared and discussed, considering the performance and the limits of each one.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

The eleven phthalates and the two non-phthalates studied plasticizers are listed in Table 1. Benzyl butyl phthalate (BBP; $\geq 98\%$), dibutyl phthalate (DBP; $\geq 99\%$), di-cyclohexyl phthalate (DCHP; $\geq 99\%$), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP; $\geq 99.5\%$), di(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHT; $\geq 97\%$), diethyl phthalate (DEP; $\geq 99.5\%$), diethyl phthalate-3,4,5,6-d₄ (DEP-d₄, IS; $\geq 98\%$), diisobutyl phthalate (DIBP; $\geq 99\%$), diisononyl phthalate (DINP; $\geq 99\%$), dimethyl phthalate (DMP; $\geq 99\%$), di-n-octyl phthalate (DNOP; $\geq 98\%$), diphenyl phthalate (DphP; $\geq 99\%$), dipropyl phthalate (DPP; $\geq 98\%$), and tri-octyl trimellitate (TOTM; $\geq 99\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). HPLC-grade solvents were used. Acetone, dichloromethane, and acetonitrile were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Ultra-pure water was supplied by a Milli-Q purification system from Millipore (St Quentin en Yvelines, France).

Table 1. Plasticizers investigated in this study.

Compound	Acronym	Molecular Formula	Molecular Mass (g/mol)	CAS Number
Phthalates				
Benzyl butyl phthalate	BBP	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	312.36	85-68-7
Dibutyl phthalate	DBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278.34	84-74-2
Dicyclohexyl phthalate	DCHP	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	330.42	84-61-7
Bis-(2-ethylhexyl) phthalate	DEHP	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390.56	117-81-7
Diethyl phthalate	DEP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222.24	84-66-2
Diisobutyl phthalate	DIBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278.34	84-69-5
Diisononyl phthalate	DINP	C ₂₆ H ₄₂ O ₄	418.61	28553-12-0
Dimethyl phthalate	DMP	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.18	131-11-3
Di-n-octyl phthalate	DNOP	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390.56	117-84-0
Diphenyl phthalate	DphP	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	318.32	84-62-8
Dipropyl phthalate	DPP	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	250.29	131-16-8
Non-phthalates				
Di-(2-ethylhexyl) terephthalate	DEHT	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390.56	6422-86-2
Tri-octyl trimellitate	TOTM	C ₃₃ H ₅₄ O ₆	546.78	3319-31-1

2.2. Plasticizers

Since the nature and the quantity of plasticizers are unknown in gloves, our challenge was to develop an exhaustive analytical method adapted for the determination of a large scale of concentrations from trace levels, for the subsidiary plasticizers, to high contents for the main ones. According to the context of substitution, regulated and alternatives plasticizers were simultaneously assessed in the present study. The plasticizers selected for the present work included two extensively used PAEs (DMP and DEP), five phthalates classified as reproductive toxicant category 1 H360 (DIBP, DBP, BBP, DCHP, and DEHP), two plasticizers

suspected to be reproductive toxicants category 2 H361 (DPP and TOTM), and three alternative plasticizers reflecting current trends in response to restriction policies (DEHT, DINP, DNOP, and DphP).

2.3. Gloves Samples

Neoprene, nitrile, latex, and vinyl gloves used at the Faculty of Pharmacy from the University of Rouen (Rouen, France), the University of Lille (Lille France), and the Rouen University Hospital (Rouen, France) were studied in this work. Ten samples were chosen from different suppliers of gloves to consider the variability in the manufacturing procedure. The distribution of sampling was the following: one neoprene-, one nitrile-, three latex-, and five vinyl-based gloves.

2.4. Gas Chromatography Method

2.4.1. GC–MS Instrumentation and Analysis Conditions

All analyses were performed using an Agilent 7890 gas chromatography system coupled with an Agilent 5975C mass spectrometer equipped with an electron impact (EI) ion source and a single quadrupole (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Chromatographic separation was achieved with a cross-linked poly 5% diphenyl/95% dimethylsiloxane HP-5-MS capillary column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film thickness) from Agilent. The oven temperature was initially set at 100 °C held for 2 min, then ramped at 30 °C min⁻¹ to 200 °C held for 1 min, then 10 °C min⁻¹ to 250 °C held for 6.5 min, and then 40 °C min⁻¹ to 280 °C held for 16 min. One microliter of each sample was injected in splitless mode using an Agilent 7693A autosampler. The solvent delay was set at 5.0 min and the run time at 35 min. The injection port and the transfer line were both heated at 280 °C. The source and the single quadrupole of the mass spectrometer temperatures were set at 230 °C and 150 °C, respectively. The carrier gas was helium at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, and ionization with an inert EI ion source was operated at 70 eV. The software MSD Chemstation E.02.02.1431 (Agilent Tech. Inc., Les Ulis, France) was used to control the instrument and was used to collect data.

2.4.2. Choice of *m/z* Ions for SIM Acquisition

The acquisition was performed on full-scan (*m/z* = 50–650) and on selected ion monitoring (SIM) mode, for which acquisition parameters are detailed in Table 2 with a dwell time of 100 ms per analyte. Sequential analysis of ions was performed using three time windows (groups 1–3). On SIM mode, two different ions were monitored for each plasticizer. They were determined according to the literature (NIST library) and after a previous injection using the full-scan mode. The retention time (RT) was determined for each analyte after the injection of a standard solution. As DINP is a mixture of structural isomers composed of variable branches C9 chained alcohol isomers, it is thus eluted as a broad mass peak. For its integration, the choice was made to select a defined portion of the multi-isomeric peak (from 18.3 to 19.5 min) to allow reproducibility.

Table 2. Acquisition parameters for the GC–MS analysis of plasticizers and internal standards.

Group	Analytes	RT (min)	Quantification Ion (m/z)	Qualification Ion (m/z)
1st group from 0 to 13 min	DMP	5.8	163.0	77.0
	DEP	6.6	149.0	177.0
	DEP-d4	6.6	153.0	181.0
	DPP	7.8	149.0	191.1
	DIBP	8.5	149.0	57.1
	DBP	9.2	149.0	223.1
	BBP	12.5	149.0	91.1
2nd group from 13 to 20 min	DCHP	14.6	249.0	149.0
	DEHP	14.8	149.0	279.0
	DphP	15.0	225.0	77.1
	DNOP	18.2	149.0	279.1
	DEHT	18.3	112.1	261.1
	DINP	18.8	293.1	149.0
3rd group from 20 to 35 min	TOTM	31.7	305.1	193.0

RT—retention time.

2.4.3. Stock and Standard Solutions

For the preparation and the storage of the standard solutions, only glass materials were used to prevent the external contribution of plasticizers from plastics. Cleaned glass materials were rinsed twice with the containing organic solvent. All individual stock solutions were prepared at a concentration of 10 g L⁻¹ in acetone for DMP, DEP, DEP-d₄ (IS), DPP, DIBP, DBP, DCHP, DEHP, DEHT, DINP, DNOP, and TOTM, or in dichloromethane for DphP and DCHP. The working solutions of the thirteen plasticizers and the IS (individual and mixture solutions) were daily prepared in acetone by diluting the stock solutions to achieve the targeted concentrations. All solutions were stored at 4 °C. For method validation, calibration standards were prepared in acetone with concentrations ranging from 0.05 to 0.5 mg L⁻¹ for DMP, DEP, DPP, DIBP, DphP, and DBP; from 0.5 to 6 mg L⁻¹ for BBP; from 0.3 to 3 mg L⁻¹ for DEHP and DEHT; from 15 to 135 mg L⁻¹ for DINP; and from 5 to 60 mg L⁻¹ for TOTM. In both cases, four validation standards were prepared at 0.06, 0.15, 0.35, and 0.50 mg L⁻¹ concentration levels for DMP, DEP, DPP, DIBP, DphP, and DBP; 0.75, 2.5, 4.5, and 6 for BBP; 0.40, 1.25, 2.25, and 3.00 mg L⁻¹ for DEHP and DEHT; 15, 45, 90, and 120 mg L⁻¹ for DINP; and 25, 45, and 60 mg L⁻¹ for TOTM.

2.4.4. Extraction Protocol

Each glove was cut into small pieces, and samples were weighted (around 30 mg) in a 5 mL glass tube. This mass was chosen for a miniaturized procedure for sample preparation. For the extraction of the plasticizers, samples were covered with 2.0 mL of acetone. Sealed glass tubes were then put into an ultrasonic bath at room temperature and sonicated for 30 min. Following the extraction step, all samples were spiked with the IS: 10 µL of a 1 mg L⁻¹ IS solution (final concentration of 0.01 mg L⁻¹) were added to 990 µL of the extract, and the final solution was vortexed prior to its injection in the GC–MS system. During the extraction step, a blank sample underwent a similar extraction procedure.

2.5. High-Performance Liquid Chromatography Method

2.5.1. HPLC–DAD Instrumentation and Analysis Conditions

Chromatographic analyses were performed using a Waters system (Milfors, MA USA) equipped with a gradient quaternary 600E metering pump, an online degasser apparatus, a 717 autosampler, and a 996 photodiode array detector. Data were collected and processed on a computer running with Empower software (version 2) from Waters. Separations were carried out on a reversed-phase Kinetex C18 (100 × 4.6 mm i.d., 2.6 μm) column (Phenomenex, Le Pecq, France). A C18 trap column (LiChrospher®100 RP18: 100 × 2.1 mm i.d., 5 μm, Interchim, Montluçon, France) was connected between the solvent mixing chamber and the injector of the HPLC apparatus. A gradient separation mode was used to separate the analytes, using acetonitrile (A) and water (B). The elution gradient performed at 0.8 mL min⁻¹ was the following: (1) 0–10 min, linear increase from 50% to 100% of solvent A; (2) 10–25 min, 100% of solvent A; (3) 25–26 min, linear decrease to 50% of solvent A; and (4) 26–35 min, 50% of solvent A. The column was thermostated at 30 °C, and the injection volume was 20 μL. Detection was performed at 225 nm except for DEHT, which was detected at 240 nm.

2.5.2. Stock and Standard Solutions

Stock and standards solutions for HPLC experiments were prepared in glass vessels using the same experimental precautions as in GC. Stock solutions of the thirteen plasticizers at 10 g L⁻¹ were prepared in acetonitrile and stored at 4 °C. A working solution containing 100 mg L⁻¹ of DINP and 10 mg L⁻¹ of DMP, DEP, DPP, DphP, BBP, DIBP, DBP, DCHP, DEHP, DEHT, DNOP, and TOTM was prepared in an acetonitrile/H₂O-50/50 (*v/v*) mixture by dilution of stock solutions. It was further diluted to obtain a solution at 2 mg L⁻¹ for DINP and 0.4 mg L⁻¹ for the other plasticizers used during the method development.

For method validation, two distinct series of calibration and validation standards were prepared. The first series, containing DMP, DEP, DPP, DphP, BBP, DBP, DCHP, DEHP, DEHT, DNOP, and TOTM, was prepared in acetonitrile/H₂O-50/50 (*v/v*) with concentrations ranging from 0.05 to 1 mg L⁻¹. The second series, prepared in the same solvent, contained DIBP and DINP at concentrations ranging from 0.05 to 1 mg L⁻¹ and from 0.5 to 10 mg L⁻¹, respectively. In both cases, four validation standards were prepared: the concentration levels of validation standards were equal to 0.15, 0.35, 0.5, and 1.0 mg L⁻¹ for all plasticizers, except for DINP, for which they were 1.5, 3.5, 5, and 10 mg L⁻¹.

2.5.3. Extraction Protocol

As for GC analysis, around 30 mg of each glove were cut into small pieces and introduced in a glass tube before the addition of 2 mL of acetone. Extraction was then performed for 30 min at room temperature by immersion of the sealed tube in an ultrasonic bath. A volume of 1.5 mL of extracts was then evaporated at room temperature under nitrogen flow. The residues were dissolved in 1 mL of acetonitrile and finally diluted in order to obtain acetonitrile/H₂O-50/50 (*v/v*) solutions that plasticizers concentration is included in the range of the calibration standard. During the extraction step, a blank sample underwent a similar extraction procedure.

2.6. Method Validation

The validation of the method was performed according to the validation guidelines proposed by the French Society of Pharmaceutical Sciences and Technologies—SFSTP [23]. In GC–MS, the validation was performed simultaneously using standard solutions containing the eleven plasticizers (DMP, DEP, DPP, DIBP, DBP, BBP, DEHP, DphP, DEHT, DINP, and TOTM) and IS. In HPLC–DAD, two distinct validations were performed: the first was dedicated to DMP, DEP, DPP, DphP, BBP, DBP, DCHP, DEHP, DEHT, DNOP, and TOTM analysis; and the second for DIBP and DINP. Hence, in each case, the validation of the method was carried out on three consecutive days to estimate the prediction errors. Each day, six calibration standards (CS) and four validation standards (VS; $n = 3$) were prepared and analyzed. Moreover, blank extracts were daily prepared and analyzed ($n = 4$; CAL0). They consisted of acetone spiked with the IS and acetonitrile/H₂O-50/50 (*v/v*) solutions for GC–MS and HPLC–DAD, respectively, and were obtained from 2 mL acetone samples having undergone extraction procedures used for each method. A blank extract without IS was also analyzed in GC–MS ($n = 4$; CAL00). Finally, specificity, response function, linearity, trueness, and precision (repeatability and intermediate precision) were studied. The acceptance criteria for precision (relative standard deviation; RSD) and trueness (recovery) were fixed at 15% and in the 85–115% range, respectively. Lastly, accuracy profiles were assessed using NeoLiCy® software (version: 1.8.2.2), considering the $\pm 15\%$ acceptance limits at a risk of 5%. They were used to determine the lower limits of quantification (LLOQ). In addition, carryover was estimated by injecting the blank samples after a mixture of the analytes (concentrations equal to the upper limit of quantification) containing or not the internal standard, according to the method evaluated. The stability of the stock solutions and working solutions was assessed by comparing freshly prepared solutions to solutions that have been stored at 4 °C for two months.

3. Results

3.1. Gas Chromatography–Mass Spectrometry

3.1.1. Optimization of the Method

The optimization of the GC–MS chromatographic conditions for the simultaneous determination of the thirteen targeted plasticizers was based on the GC–MS method developed by Gimeno et al. [7] and used for the identification and quantification of fourteen phthalates and five non-phthalate plasticizers in PVC medical devices. Several adjustments were made to optimize the method for the plasticizers of the study, including eleven phthalates (BBP, DBP, DCHP, DEHP, DEP, DIBP, DINP, DMP, DNOP, DphP, and DPP) and two non-phthalate plasticizers (DEHT and TOTM). Among the selected phthalates, it should be noted that DphP, which was not studied in the work of Gimeno et al., was selected for our study because of its interesting status as an alternative plasticizer. The successive changes made on the GC oven program allowed the total separation of nine plasticizers; DNOP, DEHT, and DINP were partially co-eluted. The identification and the quantification of the targeted plasticizers were assessed using SIM mode. For DEHT and DINP, a specific ion was selected to identify and quantify each of these analytes,

even in a mixture with other analytes. For DNOP, no specific m/z ratio was identified. Hence, DNOP was discarded from the GC-MS method. DCHP did not have an acceptable chromatographic profile to include it in our study. For this reason, eleven plasticizers can be studied in GC-MS using acquisition parameters summarized in Table 2. Figure 1 shows the chromatogram of the standard solution mixture at the estimated LLOQ.

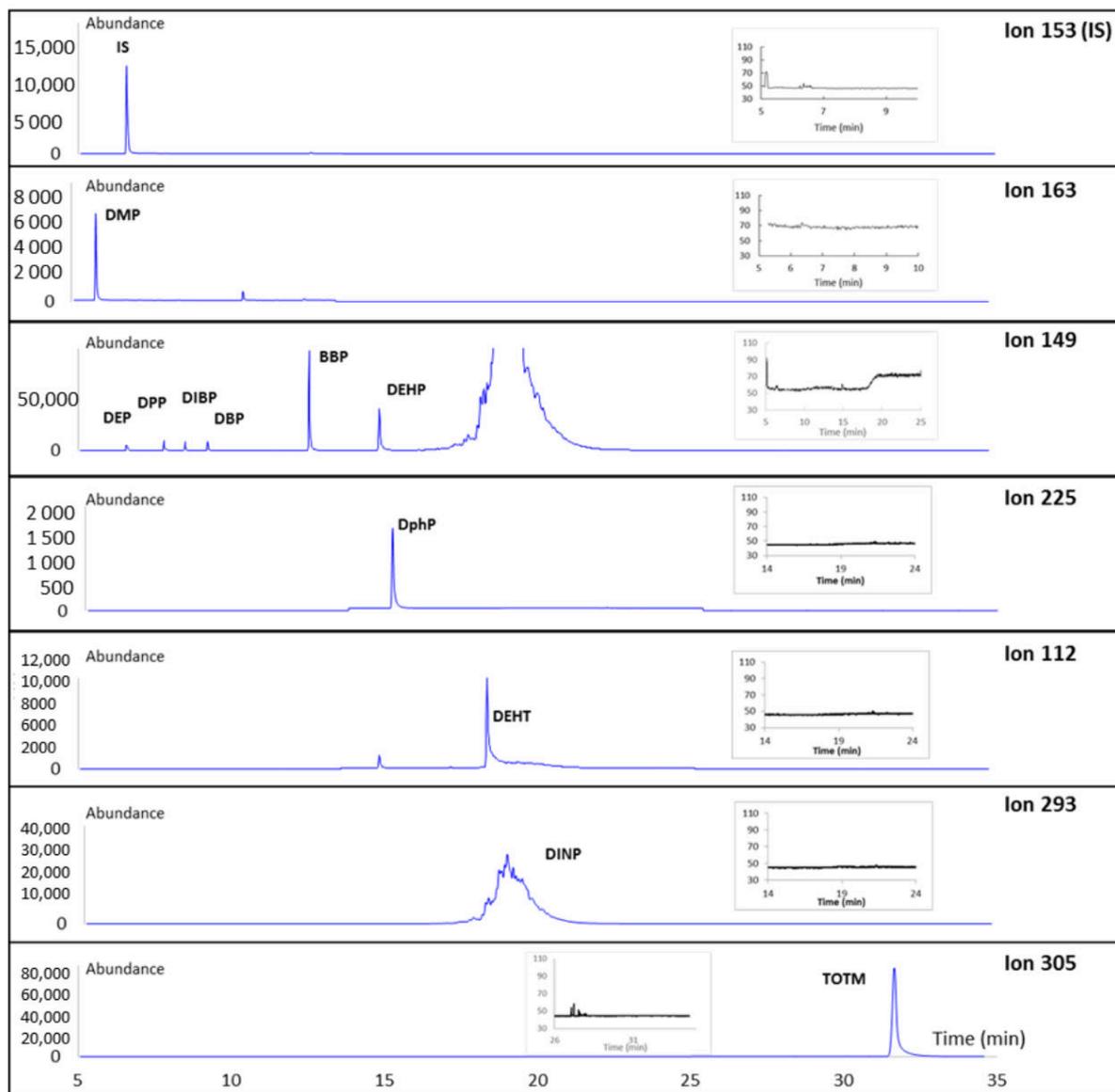


Figure 1. GC-MS chromatograms of plasticizers investigated.

SIM chromatograms of the first validation standard (blue) and a blank solution (CAL00; black). Acquisition performed on three time windows: see Table 2.

3.1.2. Validation of the Method

Firstly, the specificity of the method with respect to DMP, DEP, DPP, DIBP, DBP, BBP, DEHP, DphP, DEHT, DINP, and TOTM was assessed by comparing chromatograms obtained for the blank extracts (CAL00), a blank extract spiked with the IS at the concentration used for sample

analysis (CAL0), and a blank extract spiked with IS and the analytes at a concentration corresponding to the first VS. As illustrated in Figure 1, the absence of interfering components demonstrated the specificity of the method.

Response functions expressing the peak area ratio (analyte/IS) versus analyte concentration were established from six calibration standards: the best adjustments were obtained using least-square weighted (1/X) linear regression for DMP, DEP, DPP, DBP, DEHP, DEHT, and DIBP; least-square quadratic regression for DphP, BBP, and DINP; and least-square linear regression for TOTM. Obtained results are summarized in Table 3. The back-calculated concentrations of the calibration standards were within $\pm 15\%$ of the nominal values, even for the LLOQ. The validity of the model was attested by evaluation of the linearity of the method: whatever the analyte, the introduced concentrations and the back-calculated one can be expressed by linear models ($R^2 > 0.97$) with slopes close to the unit and y-intercept that can be considered to be equal to zero (Student's test, with $\alpha = 5\%$). Repeatability and intermediate precision were expressed as the relative standard deviation (RSD) at each concentration level. Trueness was evaluated by comparing nominal and back-calculated concentrations and was expressed as recovery. As shown in Figure 2, repeatability, i.e., intra-day precision, ranged from 1.56% to 5.45%. Concerning the intermediate precision (inter-day precision), RSD values were between 2.52% and 12.07%, except for the lowest validation standard (VS1) of DINP and TOTM that exhibited an RSD of 32.05%. Recovery varied between 94.1% and 107%. Hence, except for DINP and TOTM at the lowest concentration, the trueness and precision results are in accordance with set acceptance criteria. These results were used to calculate the upper and the lower confidence limits for validation standards required to establish the accuracy profiles (Supplementary Figure S1).

Whatever the concentration level, the tolerance interval ($\beta = 5\%$) is included in the acceptance limits set at $\pm 15\%$ for DEP, DBP, DEHT, DEHP, and TOTM. The lower limits of quantification (LLOQ) are equal to 0.020 mg L⁻¹ for DEP and DBP, to 0.40 mg L⁻¹ for DEHT and DEHP, and to 25.0 mg L⁻¹ for TOTM. For DMP, DPP, DphP, BBP, DINP, and DIBP, the accuracy profiles exhibit a tolerance interval excluded from the acceptance limits for the lowest concentrations. Hence, for each of these analytes, the LLOQ can be calculated by taking the intersection point between the acceptability limit and the corresponding tolerance interval; they are equal to 0.040 mg L⁻¹ for DMP and DPP, 0.060 mg L⁻¹ for DphP, 2.40 mg L⁻¹ for BBP, 40.14 mg L⁻¹ for DINP, and 0.05 mg L⁻¹ for DIBP.

Carryover was estimated by injecting blank extract after a mixture of the analytes (concentration equal to the upper limit of quantification). The peaks areas obtained for the blank sample following the highest concentration standard were less than 10% of the LLOQ for the analytes and less than 5% for the internal standard. These results are in accordance with the EMA criterion. None of the analytes was detected on the chromatogram, reflecting the absence of carryover. Analyte stock solutions appeared stable for two months of storage at 4 °C as assessed by a deviation from the initial concentration within $\pm 15\%$.

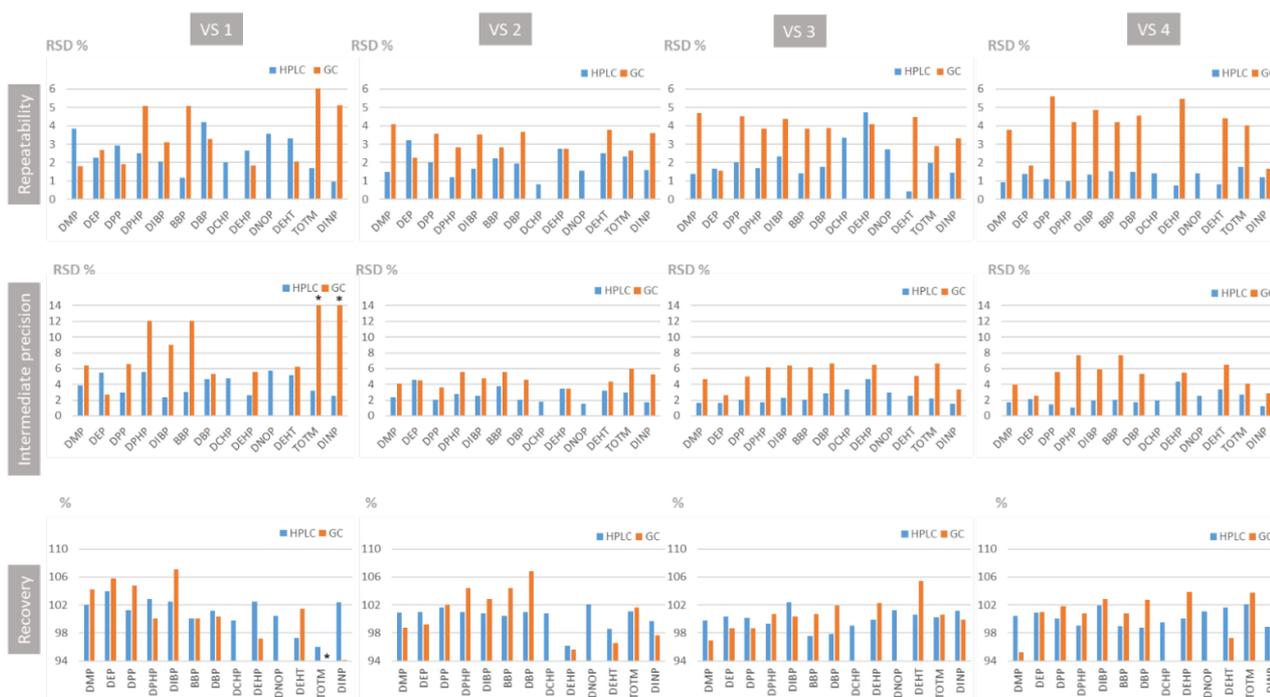


Figure 2. Repeatability, intermediate precision and recovery results of the GC–MS and HPLC–DAD method validation for the analysis of plasticizers. * RSD of intermediate precision and recovery were not in accordance with the acceptance criteria.

Table 3. Validation parameters (response function, linearity, and LLOQ) for the analysis of plasticizers by GC–MS and HPLC–DAD.

GC–MS						
Analytes	Response Function		Linearity		LLOQ (mg L ⁻¹)	
	Model	Equation	Equation	R ²		
DMP	1/x weighted linear	12.90x + 1.172 × 10 ⁻²	0.9422x + 2.761 × 10 ⁻³	0.994	0.040	
DEP	1/x weighted linear	6.456x – 3.294 × 10 ⁻²	1.001x + 3.113 × 10 ⁻⁴	0.997	0.020	
DPP	1/x weighted linear	9.337x + 8.978 × 10 ⁻³	1.007x + 2.870 × 10 ⁻⁴	0.991	0.040	
DphP	quadratic	1.315x ² + 1.377x – 4.667 × 10 ⁻³	1.004x + 9.521 × 10 ⁻⁴	0.98	0.060	
BBP	quadratic	0.4008x ² + 6.262 × 10 ⁻¹ x + 2.761 × 10 ⁻¹	1.018x + 8.234 × 10 ⁻²	0.994	2.4	
DBP	1/x weighted linear	8.154x + 2.770 × 10 ⁻²	1.022x + 7.642 × 10 ⁻⁴	0.99	0.020	
DCHP	-	-	-	-	-	
DEHP	1/x weighted linear	1.950x – 2.870 × 10 ⁻¹	1.056x – 7.081 × 10 ⁻²	0.98	0.40	
DNOP	-	-	-	-	-	
DEHT	1/x weighted linear	0.3805x – 5.397 × 10 ⁻²	0.993x + 1.280 × 10 ⁻²	0.98	0.40	
DINP	quadratic	0.002715x ² + 1.201 × 10 ⁻¹ x + 2.067 × 10 ⁻¹	1.005x – 1.200	0.993	40	
TOTM	linear	0.09951x – 1.763	1.050x – 1.173	0.98	25	
DIBP	1/x weighted linear	7.609x + 1.475 × 10 ⁻²	0.9671x + 8.764 × 10 ⁻⁴	0.97	0.050	
HPLC–DAD						
Analytes	Response Function		Linearity		LLOQ (mg L ⁻¹)	
	Model	Equation	Equation	R ²		
DMP	linear	55,234x – 344	1.007x – 5.54 × 10 ⁻⁴	0.999	0.050	
DEP	1/x weighted linear	50,225x – 253	1.004x + 3.60 × 10 ⁻³	0.998	0.050	
DPP	1/x weighted linear	44,732x – 243	0.9946x + 4.90 × 10 ⁻³	0.999	0.050	
DphP	linear	51,953x + 7	0.9848x + 5.77 × 10 ⁻³	0.999	0.050	
BBP	linear	39,713x + 78	0.9832x + 4.00 × 10 ⁻³	0.998	0.050	
DBP	linear	40,661x + 274	0.9804x + 5.62 × 10 ⁻³	0.998	0.050	
DCHP	linear	34,991x + 2.5	0.9922x + 2.57 × 10 ⁻³	0.998	0.050	
DEHP	linear	28,433x – 161	0.9877x + 5.30 × 10 ⁻²	0.996	0.050	
DNOP	linear	28,041x + 94	1.010x + 1.60 × 10 ⁻³	0.998	0.050	
DEHT	linear	65,922x + 405	1.011x + 9.90 × 10 ⁻⁴	0.997	0.050	
DINP	1/x weighted linear	16,323x + 1020	0.9853x + 5.98 × 10 ⁻³	0.9994	0.50	
TOTM	linear	27,046x – 141	1.024x – 5.45 × 10 ⁻³	0.998	0.050	
DIBP	linear	44,105x – 1248	1.020x - 7.49 × 10 ⁻⁴	0.9997	0.050	

3.2. High Performance Liquid Chromatography–UV Detection

3.2.1. Optimization of the Method

Optimization of the Elution Gradient

Firstly, performances of a biphenyl (250 × 4.6 mm; 5 μm) and a Kinetex C18 (100 × 4.6 mm i.d., 2.6 μm; Phenomenex) columns were evaluated using acetonitrile (A) and water (B) at 0.8 mL min⁻¹ and the following elution gradient: (1) 0–20 min, linear increase from 60% to 100% of solvent A; (2) 20–35 min, 100% of solvent A; (3) 35–36 min, linear decrease to 60% of solvent A; and (4) 36–46 min, 50% of solvent A. A mixture of thirteen plasticizers at 0.4 mg L⁻¹, except DINP at 2 mg L⁻¹, was injected in each column thermostated at 30 °C. While the biphenyl phase led to eleven peaks, of which only four were separated (*R*_s > 1.5), the C18 phase permitted to detect thirteen peaks, of which seven were totally resolved. Moreover, peak efficiencies were greater using the C18 phase (twice factor). The Kinetex C18 column was then selected to further optimize the separation conditions by changing the initial acetonitrile content and the gradient shape. Hence, optimal separation was obtained using the following elution gradient: (1) 0–10 min, linear increase from 50% to 100% of solvent A; (2) 10–25 min, 100% of solvent A; (3) 25–26 min, linear decrease to 50% of solvent A; and (4) 26–35 min, 50% of solvent A. Figure 3 depicts the resulting chromatogram (blue line). As shown in the insert, despite gradient modification, DIBP and DBP were partially resolved (*R*_s = 1.09). Hence, if DIBP and DBP are both present in gloves, their quantification will not be possible using the HPLC–DAD method. Moreover, DINP, which corresponds to a complex mixture of C9 ester isomers, was co-eluted with DEHT. In mixture with DEHT, quantification of DINP could be performed at its maximal absorbance wavelength, i.e., 225 nm, using the first part of the recording signal (from 21.20 to 21.68 min) to avoid errors resulting from the residual signal of DEHT measured at 225 nm. For DEHT, quantification at 240 nm can be envisaged as the absorbance of DINP is negligible at this wavelength.

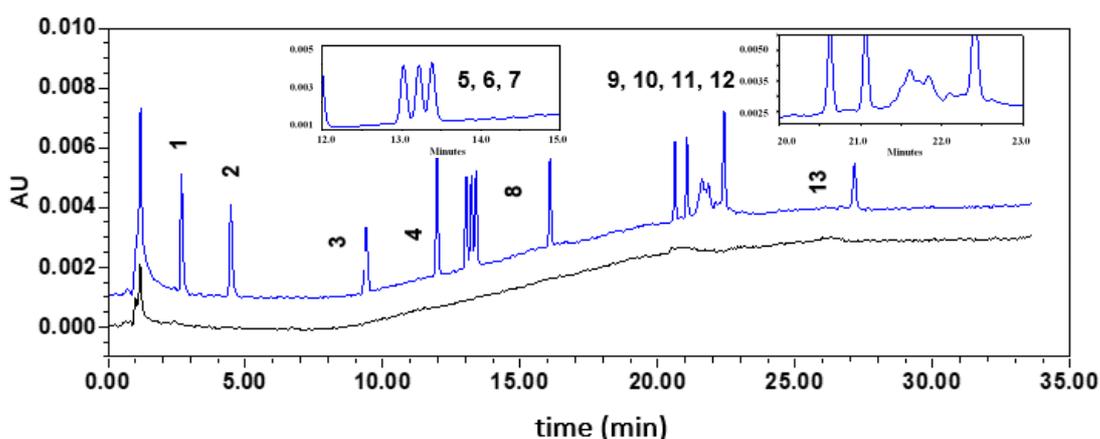


Figure 3. HPLC–DAD chromatograms of plasticizers investigated. Chromatograms of the first validation standard (blue) and a blank solution (CAL0; black). Compounds were eluted between 2.8 and 27.3 min according to the following order: (1) DMP, (2) DEP, (3) DPP, (4) DphP, (5) BBP, (6) DIBP, (7) DBP, (8) DCHP, (9) DEHP, (10) DNOP, (11) DINP, (12) DEHT, and (13) TOTM. Inserted chromatograms correspond to a zoom of the 12–16 min and 20–23 min periods.

Setting-Up a Trap Column

Injection of an acetonitrile/H₂O-50/50 (*v/v*) solution (composition equivalent to the mobile phase at the beginning of the gradient) in the optimal experimental conditions exhibited a residual peak for DEHT, whose intensity was greater each day just after system switching on. After a deep investigation, we concluded that this contamination resulted from the LC-system, probably from the leaching of DEHT contained in the HPLC tubings. This phenomenon was avoided by connecting a C18 trap column (100 × 2.1 mm i.d., 5 μm) between the solvent mixing chamber and the injector of the HPLC apparatus, as suggested by Descat et al. [24] for DEHP analysis. No change in the chromatographic parameters was observed.

3.2.2. Validation of the Method

Firstly, the specificity of the method with respect to DMP, DEP, DPP, DpHP, BBP, DIBP, DBP, DCHP, DEHP, DINP, DEHT, DNOP, and TOTM was assessed by comparing chromatograms obtained for the blank extracts (CAL0) and a blank extract spiked with the analytes at the concentration corresponding to the first VS (Figure 4). The absence of interfering components demonstrated the specificity of the method.

According to the separative performances of the method (partial resolution of DIBP and DBP) and coelution of DINP and DEHT, two series of six calibration standards were prepared: the first series contained DMP, DEP, DPP, DpHP, BBP, DBP, DCHP, DEHP, DEHT, DNOP, and TOTM, while the second contained DIBP and DINP. They were used to assess the response functions expressing the peak area versus concentration using least-square linear regression for all compounds except for DEP, DPP, and DINP, for which least-square weighted (1/X) linear regression was used. Obtained results are summarized in Table 3. The back-calculated concentrations of the calibration standards were within ± 15% of the nominal values, even for the LLOQ. Concerning DINP, it is noteworthy that the response function was established considering the area of the peaks of the compounds included in the complex mixture eluted alone, i.e., separate from DEHT, eluted between 21.20 and 21.68 min (time range of 0.48 min from the peak start). It could be used for its quantification alone or in a mixture with DEHT. As for the GC-MS method, the validity of the model was attested by evaluation of the linearity of the method (Student's test, $\alpha = 5\%$) (Table 3). As shown in Figure 2, RSD expressing repeatability ranged from 0.43% to 4.71%. Concerning the intermediate precision, RSD values were between 1.21% and 5.98%. Recovery varied between 96.0% and 104%. These trueness and precision results, in accordance with set acceptance criteria, were used to calculate the upper and the lower confidence limits for validation standards required to establish the accuracy profiles (Supplementary Figure S2). Whatever the concentration level, the tolerance interval ($\beta = 5\%$) was included in the acceptance limits set at ±15%. Hence, the lower limit of quantification (LLOQ) was equal to 0.05 mg L⁻¹ for all compounds except for DINP, which exhibited an LLOQ equal to 0.5 mg L⁻¹. As in GC-MS, no carryover was highlighted, and analyte stock solutions appeared stable for two months of storage at 4 °C.

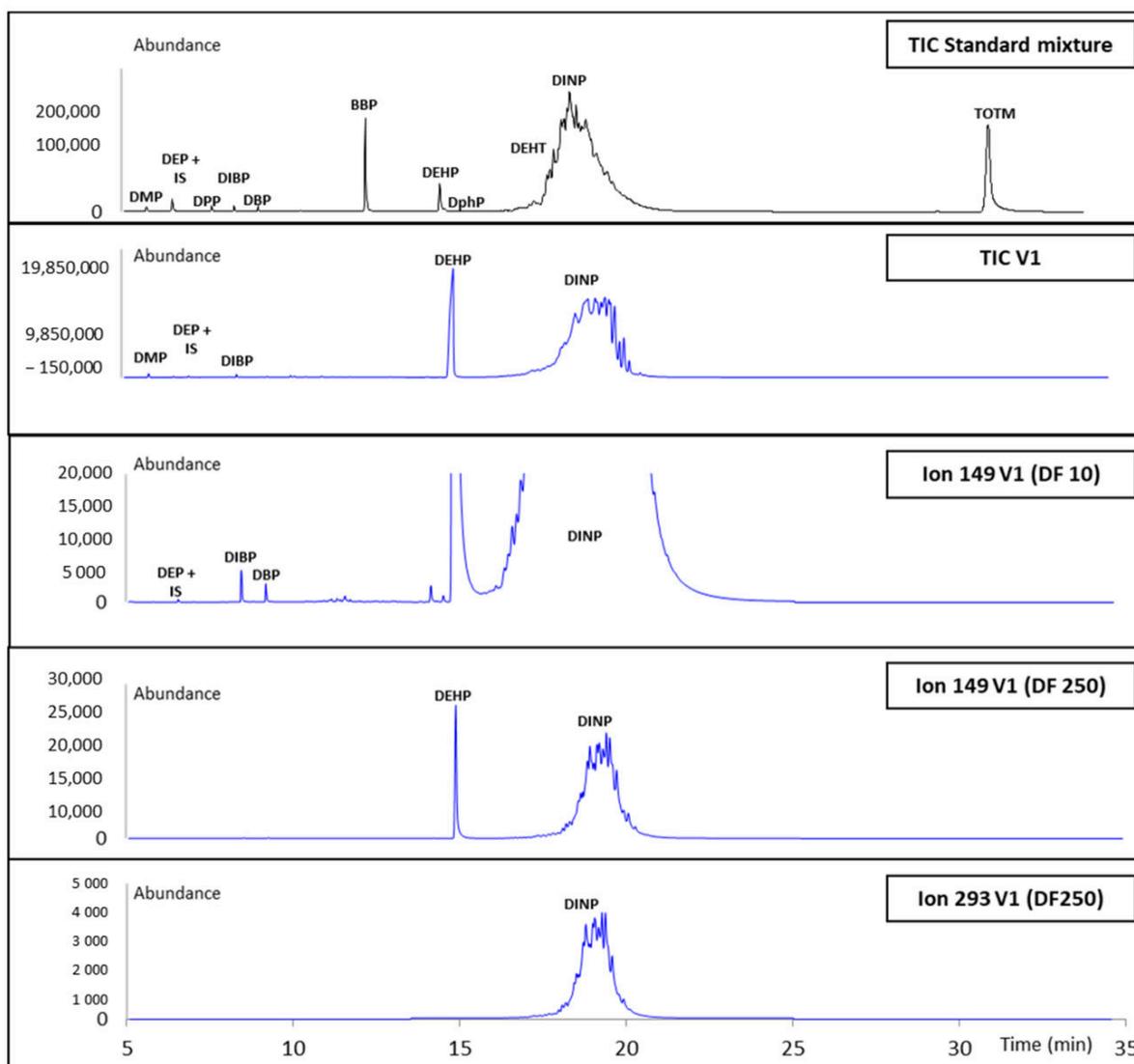


Figure 4. GC–MS chromatograms of the calibration standard SC2 (black) and a solution prepared from the V1 glove extraction (blue) at different dilution factors (DF 10 and 250). DF: dilution factor.

3.3. Application to Gloves Analysis

Several strategies are described in the literature for the extraction of plasticizers from PVC medical devices [25]. Simplicity, rapidity, and efficiency of solvent extraction led us to select this approach as in the study of Chao et al., which showed the extraction of different plasticizers from vinyl, nitrile, and neoprene gloves [11]. Around 30 mg of each glove (corresponding to an area of 1.5 cm²) were cut into small pieces and introduced in a glass tube before the addition of the extraction solvent. The sealed tube was then immersed in an ultrasonic bath to perform the extraction. As extraction yield was shown to depend on the solvent used, especially on its polarity, different solvents were evaluated, i.e., cyclohexane, dichloromethane, and acetone. Indeed, it is difficult to choose a solvent based on the literature, as data available concern only extraction of a restricted number of plasticizers (DBP, DEHP, DEHT, and TOTM from PVC medical devices or gloves) and show that a solvent suitable for one plasticizer may not be convenient for another [11,26]. Preliminary experiments have shown that vinyl and neoprene gloves melt

in dichloromethane and that extractions performed in acetone lead to a greater number of peaks in GC–MS. Hence, acetone was selected as an extraction solvent. The influence of the volume of acetone (from 2 to 4 mL) and duration of the extraction (from 10 to 60 min) using ultrasounds were evaluated at room temperature. It is noteworthy that the solvent volume must permit complete immersion of the glove sample and avoid reaching the solubility limit of the plasticizer during extraction. The use of 2 mL of acetone combined with the application of ultrasounds for 30 min was finally selected to obtain extracts in a short time, with higher plasticizers concentrations for better detection.

This protocol was applied to ten different glove samples: five vinyl gloves (V1–V5), three latex gloves (L1–L3), one nitrile glove (N1), and one neoprene glove (Neo1), in order to check the presence of plasticizers and to determine their contents. Each glove sample was extracted six times independently; the first three extracts were analyzed by GC–MS and the others by HPLC–DAD, applying a separate sample preparation protocol for each method (see experimental section). For GC–MS analysis, the extract was spiked with IS (dilution negligible), leading to a sample that can be either directly analyzed (to detect a great number of plasticizers) or after a dilution step in order to obtain a response in the range suitable for their quantification (dilution factor between 2 and 2000). For HPLC–DAD analysis, as solubility in acetone and in the mobile phase used at the beginning of the gradient (ACN/H₂O-50/50 (*v/v*) mixture) differs, a solvent exchange was performed to avoid precipitation of analytes in the system: a 1.5 mL volume of the extract was evaporated at room temperature under nitrogen flow. The residue was dissolved in 1 mL of ACN. This solution was first diluted using a minimal dilution factor (two-fold factor for nitrile and latex gloves; 10-fold factor for neoprene gloves, and 500-fold for vinyl gloves, respectively) in order to obtain an ACN/H₂O-50/50 (*v/v*) solution which plasticizers concentration was just under the solubility limit to detect and identify a great number of them. Secondly, to quantify them, an appropriate dilution is necessary to include their concentration in the calibration range.

In HPLC–DAD, according to the dilution performed, among the thirteen plasticizers searched, none of them was detected in nitrile and neoprene gloves. For latex gloves, DIBP and DBP were observed in the extracts but not quantified. In vinyl gloves, high quantities of plasticizers led us to apply high dilution factors, resulting in the quantification of DEHP, DINP, and/or DEHT, exclusively. It is noteworthy that the two additional plasticizers that can be quantified in HPLC–DAD with respect to GC–MS (DCHP and DNOP) were finally not detected in the extracts.

Concerning GC–MS, while this method exhibits higher limits of detection with respect to HPLC–DAD, as a negligible dilution is performed before the first analysis, it allows to highlight the presence of at least four plasticizers in all gloves and to quantify them systematically.

Typical chromatograms for a vinyl (V1) glove sample obtained using GC–MS and HPLC–DAD methods are shown in Figures 4 and 5. Only seven out of the thirteen plasticizers studied have been identified in glove samples (DMP, DEP, DIBP, DBP, DEHP, DEHT, and DINP). DINP, DIBP, and DBP have been detected in all samples. As expected, according to the literature [11], a total amount of plasticizers of less than 0.2% (*w/w*) has been detected in nitrile, neoprene, and latex gloves (data not shown). Results obtained for the analysis of plasticizers in the five vinyl gloves are presented in Table 4. The total amount of plasticizers in vinyl gloves were

ranging from 30% to 44% (*w/w*), with trace levels of minority plasticizers. Whereas the contents of majority plasticizers determined by GC–MS and HPLC–DAD are matching, the minority plasticizers have not been quantified by HPLC–DAD. Figure 6 shows the distribution of the majority of plasticizers in the five vinyl gloves analyzed in GC–MS. The repartition of the three majority plasticizers, i.e., DEHP, DINP, and DEHT, in vinyl gloves is very disparate. DEHP was quantified in all the vinyl gloves, with contents ranging from 0.00062% (*w/w*) to 4.10% (*w/w*), while DINP was only present in four vinyl gloves with a content ranging from 16.5% (*w/w*) to 35.8% (*w/w*). DEHT was mostly quantified in the V5 glove (44.4% (*w/w*)). Since the extraction validation was made without glove standards, plasticizer contents were considered only as estimations.

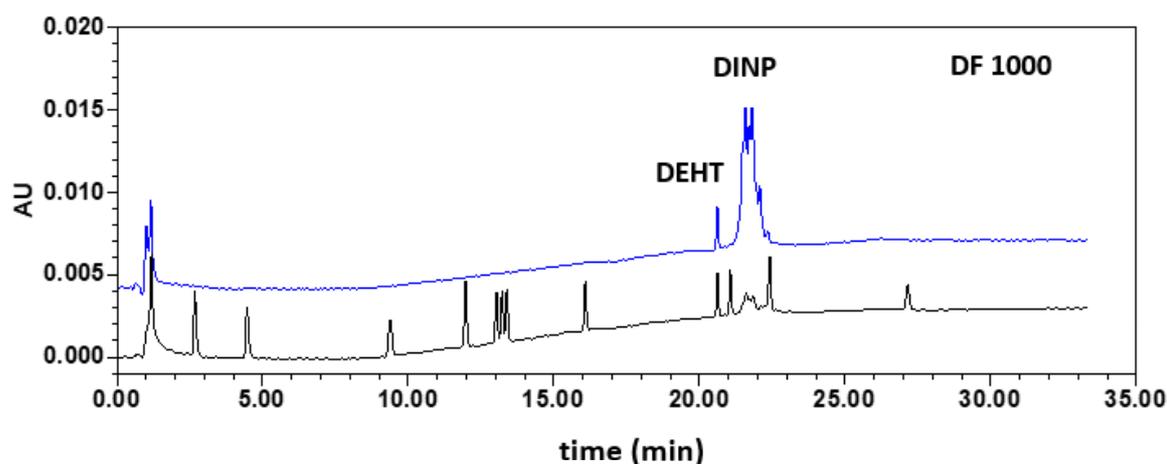


Figure 5. HPLC–DAD chromatograms ($\lambda = 225$ nm) of the calibration standard SC2 (black) and a solution prepared from the V1 glove at a dilution factor of 1000 (blue). DF—dilution factor.

Table 4. Amount (% *w/w*) of plasticizers \pm standard deviation (three replicates by method) found in five vinyl gloves studied ND: C < LLOQ.

Analytes	Method	% Plasticizers (<i>w/w</i>)				
		V1	V2	V3	V4	V5
DMP	GC–MS	$(4.83 \pm 0.33) \times 10^{-4}$	$(4.67 \pm 0.27) \times 10^{-4}$	ND	ND	ND
	HPLC–DAD	ND	ND	ND	ND	ND
DEP	GC–MS	$(5.83 \pm 0.67) \times 10^{-4}$	$(3.00 \pm 0.40) \times 10^{-4}$	ND	ND	ND
	HPLC–DAD	ND	ND	ND	ND	ND
DIBP	GC–MS	$(9.68 \pm 0.79) \times 10^{-3}$	$(4.80 \pm 0.10) \times 10^{-3}$	$(8.00 \pm 0.34) \times 10^{-4}$	$(1.00 \pm 0.34) \times 10^{-3}$	$(5.20 \pm 0.87) \times 10^{-4}$
	HPLC–DAD	ND	ND	ND	ND	ND
DBP	GC–MS	$(4.97 \pm 0.40) \times 10^{-4}$	$(2.00 \pm 0.07) \times 10^{-3}$	$(3.33 \pm 0.30) \times 10^{-4}$	$(1.67 \pm 0.28) \times 10^{-3}$	$(1.87 \pm 0.30) \times 10^{-3}$
	HPLC–DAD	ND	ND	ND	ND	ND
DEHP	GC–MS	1.58 ± 0.09	$(8.73 \pm 0.03) \times 10^{-3}$	$(3.39 \pm 0.02) \times 10^{-1}$	4.10 ± 0.41	$(6.20 \pm 0.66) \times 10^{-4}$
	HPLC–DAD	1.92 ± 0.25	ND	0.297 ± 0.034	3.65 ± 0.64	ND
DEHT	GC–MS	ND	14.9 ± 1.3	$(4.77 \pm 0.13) \times 10^{-2}$	$(3.87 \pm 0.72) \times 10^{-2}$	44.4 ± 2.4
	HPLC–DAD	ND	15.6 ± 1.6	ND	ND	36.3 ± 3.7
DINP	GC–MS	35.8 ± 4.5	16.5 ± 0.8	30.2 ± 3.1	35.7 ± 0.5	ND
	HPLC–DAD	40.1 ± 1.2	16.4 ± 1.3	32.9 ± 1.0	35.3 ± 0.9	ND

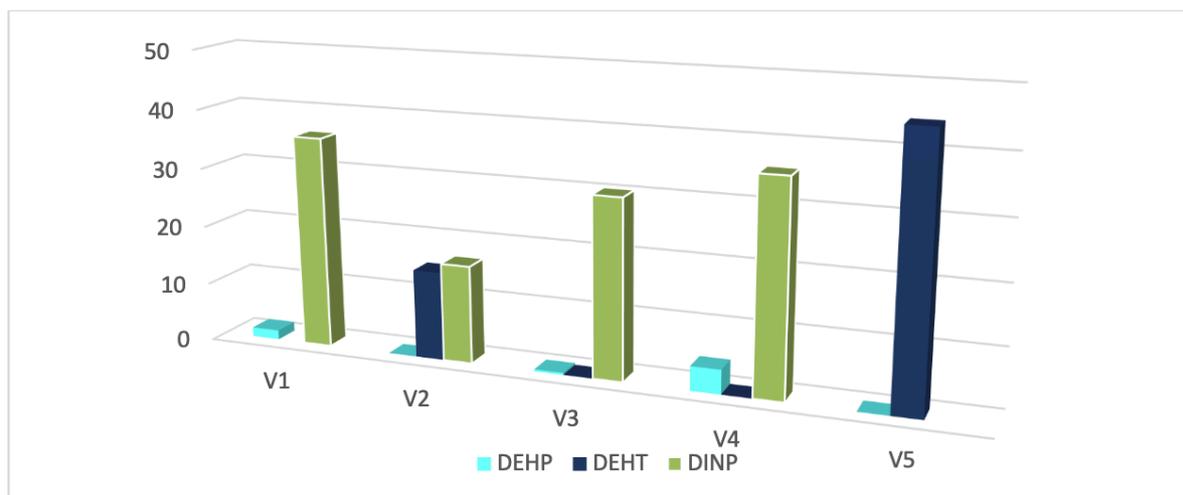


Figure 6. Contents of the majority plasticizers in the five vinyl gloves studied, determined by GC-MS.

4. Discussion

Human exposure can occur not only through ingestion, inhalation, and parenteral route but also through dermal absorption [13–20]. Dermal exposure is often considered a negligible route of exposure to plasticizers in comparison to other routes. With regard to the results of quantification of the plasticizers in gloves which are described in this study, it seems appropriate to review the dermal route in light of these new elements. Indeed, the results highlight high contents for DEHP, DEHT, and DINP in vinyl gloves. Hence, supplementary data are needed because, to date, skin exposure to plasticizers with gloves remains poorly described. These results should be then completed with additional studies on the migration of plasticizers with the purpose to provide new data for appropriate evaluation. This will reflect in a more relevant way of the real exposure since the migration of plasticizers from gloves is worrying due to direct dermal contact and can contribute to greater concern with possible toxic effects in the human body. Consequently, current legislations seem inappropriate because the recommendations do not include gloves despite the fact that they are manufactured with plasticizers. The limited information available about the content of plasticizers in gloves made it a sensitive issue, especially because it was not considered a topic of research in their own right.

5. Conclusions

In this study, the analytical performances of two orthogonal methods, i.e., GC-MS and HPLC-DAD, were compared for the identification and the quantification of plasticizers in protective gloves. After optimization, both analytical methods were validated according to the total error approach. In GC-MS, while higher limits of detection and quantification were obtained with respect to HPLC-DAD, a lower dilution factor applied to glove extracts before their analysis allowed to quantify the minority plasticizers. This method can be applied to a larger sample of gloves.

This study has shown that the content of plasticizers in protective gloves is variable depending on the type of glove (latex, nitrile, neoprene, or vinyl). As expected, results point out a predominant use of plasticizers

in vinyl gloves with an amount that should be of concern. While DEHP is classified as a toxic substance for reproduction 1B, it was quantified in the ten different glove samples studied. The results of this study demonstrate that workers wearing gloves for chemical protection are faced with an additional source of exposure to phthalates. To reduce human exposure to some phthalates, this work could initiate the first steps to a glove selection process with consideration for the plasticizers' content.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Accuracy profiles of each investigated plasticizer obtained by GC-MS. Figure S2: Accuracy profiles of each investigated plasticizer obtained by HPLC-DAD.

Author Contributions: Conceptualization, T.R.-F., M.L. and C.F.; methodology, K.P., R.R., M.L. and T.R.-F.; software, C.D., M.L. and K.P.; validation, M.L., C.D. and C.F.; formal analysis, T.R.-F., C.F., M.L. and C.D.; investigation, K.P., R.R., T.R.-F.; resources, T.R.-F., M.L.; data curation, T.R.-F. and C.F.; writing—original draft preparation, K.P., T.R.-F., C.F. and M.L.; writing—review and editing, C.M., T.R.-F., C.F., M.L., visualization, C.M., P.V.; supervision, C.F. and C.M.; project administration, C.M. and T.R.-F.; funding acquisition, C.M. and C.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financially supported by the University of Rouen Normandy and by the Regional Council of Normandy in the framework of RN-BEE.

Institutional Review Board Statement: Not applicable

Informed Consent Statement: Not applicable

Acknowledgments: The authors would like to thank the University of Rouen Normandy and by the Regional Council of Normandy for funding support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Employer Payment for Personal Protective Equipment; Final Rule|Occupational Safety and Health Administration. Available online: <https://www.osha.gov/laws-regs/federalregister/2007-11-15-0> (accessed on 10 April 2020).
2. Ito, Y.; Yamanoshita, O.; Asaeda, N.; Tagawa, U.; Lee, C.L.; Aoyama, T.; Ichihara, G.; Furuhashi, K.; Kamijima, M.; Gonzalez, F.J.; et al. Di(2-ethylhexyl)phthalate induces hepatic tumorigenesis through a peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent pathway. *J. Occup. Health* **2007**, *49*, 172–182, <https://doi.org/10.1539/joh.49.172>.
3. Johnson, K.J.; Heger, N.E.; Boekelheide, K. Of Mice and Men (and Rats): Phthalate-Induced Fetal Testis Endocrine Disruption Is Species-Dependent. *Toxicol. Sci.* **2012**, *129*, 235–248, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs206>.
4. Mariana, M.; Feiteiro, J.; Verde, I.; Cairrao, E. The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review. *Environ. Int.* **2016**, *94*, 758–776, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.07.004>.
5. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures, Amending and Repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and Amending Regulation (EC) No 1907/2006 (Text with EEA relevance). 2008. Available online: <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/1272/oj/eng> (accessed on 7 April 2020).
6. Malarvannan, G.; Onghena, M.; Verstraete, S.; van Puffelen, E.; Jacobs, A.; Vanhorebeek, I.; Verbruggen, S.C.; Joosten, K.F.; Berghe, G.V.D.; Jorens, P.G.; et al. Phthalate and alternative plasticizers in indwelling medical devices in pediatric intensive care units. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *363*, 64–72, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.09.087>.
7. Gimeno, P.; Thomas, S.; Bousquet, C.; Maggio, A.-F.; Civade, C.; Brenier, C.; Bonnet, P.-A. Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC-MS. *J. Chromatogr. B* **2014**, *949–950*, 99–108, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.037>.
8. Bernard, L.; Bourdeaux, D.; Pereira, B.; Azaroual, N.; Barthelemy, C.; Breyse, C.; Chennell, P.; Cuffe, R.; Dine, T.; Eljezi, T.; et al. Analysis of plasticizers in PVC medical devices: Performance comparison of eight analytical methods. *Talanta* **2017**, *162*, 604–611, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.033>.
9. Chao, K.-P.; Huang, C.-S.; Wei, C.-Y. Health risk assessments of DEHP released from chemical protective gloves. *J. Hazard. Mater.* **2015**, *283*, 53–59, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.010>.
10. Petersen, J.H.; Jensen, L.K. Phthalates in soft PVC products used in food production equipment and in other food contact materials on the Danish and the Nordic Market 2013-2014. *Int. J. Food Contam.* **2016**, *3*, 3, <https://doi.org/10.1186/s40550-016-0026-6>.

11. Chao, K.-P.; Huang, C.-S.; Wei, C.-Y. Extraction and percolation of PAEs from chemical protective gloves. *Polym. Test.* **2013**, *32*, 1551–1557, <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2013.10.004>.
12. Tsumura, Y.; Ishimitsu, S.; Kaihara, A.; Ii, K.Y.; Nakamura, Y.; Tonogai, Y. Di(2-ethylhexyl) phthalate contamination of retail packed lunches caused by PVC gloves used in the preparation of foods. *Food Addit. Contam.* **2001**, *18*, 569–579, <https://doi.org/10.1080/02652030120071>.
13. Haned, Z.; Moulay, S.; Lacorte, S. Migration of plasticizers from poly(vinyl chloride) and multilayer infusion bags using selective extraction and GC–MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *156*, 80–87, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.04.011>.
14. Tsai, M.-Y.; Ho, C.-H.; Chang, H.-Y.; Yang, W.-C.; Lin, C.-F.; Lin, C.-T.; Xue, Y.-J.; Lai, J.-M.; Wang, J.-H.; Chang, G.-R. Analysis of Pollution of Phthalates in Pork and Chicken in Taiwan Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry and Assessment of Health Risk. *Molecules* **2019**, *24*, 3817, <https://doi.org/10.3390/molecules24213817>.
15. Fromme, H.; Schütze, A.; Lahrz, T.; Kraft, M.; Fembacher, L.; Siewering, S.; Burkardt, R.; Dietrich, S.; Koch, H.; Völkel, W. 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* **2015**, *219*, 33–39, <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.08.002>.
16. Larsson, K.; Lindh, C.; Jönsson, B.A.; Giovanoulis, G.; Bibi, M.; Bottai, M.; Bergström, A.; Berglund, M. Phthalates, non-phthalate plasticizers and bisphenols in Swedish preschool dust in relation to children's exposure. *Environ. Int.* **2017**, *102*, 114–124, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.02.006>.
17. Bourdeaux, D.; Yessaad, M.; Chennell, P.; Larbre, V.; Eljezi, T.; Bernard, L.; Sautou, V. Analysis of PVC plasticizers in medical devices and infused solutions by GC–MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *118*, 206–213, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.034>.
18. Wormuth, M.; Scheringer, M.; Vollenweider, M.; Hungerbühler, K. What Are the Sources of Exposure to Eight Frequently Used Phthalic Acid Esters in Europeans? *Risk Anal.* **2006**, *26*, 803–824, <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2006.00770>.
19. Guo, Y.; Kannan, K. Challenges encountered in the analysis of phthalate esters in foodstuffs and other biological matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404*, 2539–2554, <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5999-2>.
20. European Chemicals Bureau, European Union Risk Assessment Report Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). 80, 2nd Priority List. 2008. Available online: <http://op.europa.eu/fr/publication-detail/-/publication/80eaeafa-5985-4481-9b837b5d39241d52> (accessed on 10 January 2021).
21. Kemper, B.; Lichtblau, D.A. Extraction of plasticizers: An entire and reproducible quantification method for historical cellulose acetate material. *Polym. Test.* **2019**, *80*, 106096, <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.106096>.
22. Shen, H.-Y. Simultaneous screening and determination eight phthalates in plastic products for food use by sonication-assisted extraction/GC–MS methods. *Talanta* **2005**, *66*, 734–739, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.12.021>.
23. Hubert, P.; Nguyen-Huu, J.-J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Cohen, N.; Compagnon, P.-A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—Part III. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 82–96, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.032>.
24. Descat, A.; Lecoeur, M.; Kouach, M.; Goossens, L.; Thelliez, A.; Odou, P.; Decaudin, B.; Goossens, J.-F. Simultaneous determination of di(2-ethylhexyl) phthalate and diisononylcyclohexane-1,2-dicarboxylate and their monoester metabolites in four labile blood products by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *181*, 113063, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113063>.
25. Bernard, L.; Décaudin, B.; Lecoeur, M.; Richard, D.; Bourdeaux, D.; Cuff, R.; Sautou, V. 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>.
26. Bernard, L.; Cuff, R.; Breyse, C.; Décaudin, B.; Sautou, V. Migrability of PVC plasticizers from medical devices into a simulant of infused solutions. *Int. J. Pharm.* **2015**, *485*, 341–347, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.030>.

Article 2

Article en préparation

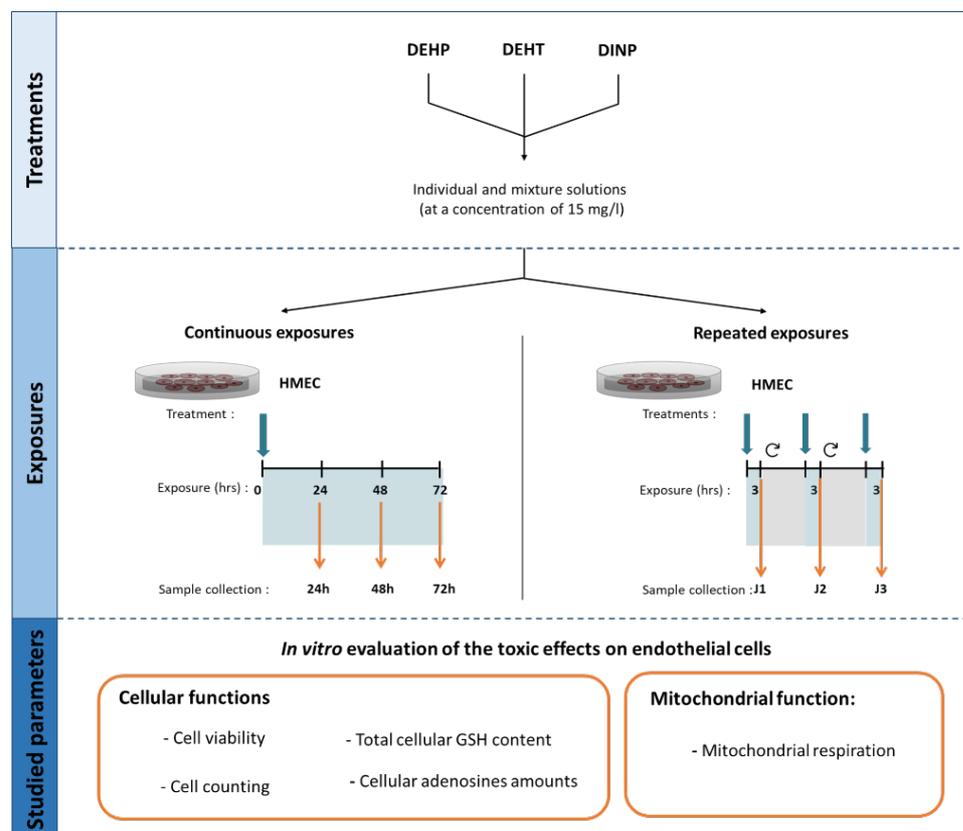
Effects of DEHP, DEHT and DINP alone or in a mixture on cell viability and mitochondrial metabolism of endothelial cells *in vitro*

Kelly Poitou, Tiphaine Rogez-Florent, Anaïs Dirninger, Cécile Corbière, Christelle Monteil*

Normandie Univ UNIROUEN, UNICAEN, ABTE, 76000 Rouen, France

* Correspondence: christelle.monteil@univ-rouen.fr

Graphical abstract



Contexte

Les plastifiants sont des substances omniprésentes de notre vie quotidienne car ils sont utilisés dans de nombreux produits de consommation. L'exposition humaine aux plastifiants se caractérise par un contexte de multi-exposition. Les voies et les sources d'exposition étant multiples et pouvant se combiner, cela entraîne une exposition à des mélanges de plastifiants. Cela est préoccupant car plusieurs études ont rapporté l'implication des plastifiants dans différentes toxicités d'organes. Le système vasculaire permet la distribution des plastifiants au sein de l'organisme, et par ce biais ils peuvent interagir avec l'endothélium. Cependant, les effets endothéliaux ont été très peu étudiés. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude a été d'évaluer la toxicité *in vitro* des plastifiants sur les cellules endothéliales (HMEC-1) en considérant trois plastifiants d'intérêt (DEHP, DEHT et DINP). Sachant que les plastifiants peuvent interagir entre eux, les expositions ont été réalisées avec les molécules seules et avec le mélange des trois. Plusieurs paramètres ont été étudiés à la suite des expositions, il s'agit de la viabilité cellulaire, du comptage cellulaire, du glutathion total, des adénosines phosphates intracellulaires et de la respiration mitochondriale. Pour étudier la relation effet-temps, les expositions cellulaires ont été réalisées de manière continue (24, 48 et 72 heures) et répétée (3h/jour pendant 3 jours).

Principaux résultats

D'une manière générale, le DEHT est le seul plastifiant testé qui n'a pas montré de modifications au niveau endothélial pour tous les paramètres étudiés. Pour les autres conditions, l'induction d'un stress au niveau endothélial a été observée. La viabilité cellulaire (test MTT) a été modifiée avec les deux protocoles d'exposition, ce qui témoigne de perturbations des fonctions physiologiques cellulaires. Mais les effets ne sont pas comparables entre les expositions continues et répétées. Les expositions continues se caractérisent par une augmentation transitoire à 24 heures suivie d'une diminution de la viabilité cellulaire pour le DEHP, le DINP et le mélange, alors que l'augmentation persiste pour les expositions répétées au DEHP ou au mélange. À noter toutefois que cette augmentation ne se traduit pas par une augmentation de la prolifération cellulaire estimée par le test d'exclusion au bleu trypan.

Pour comprendre la nature des effets induits par les plastifiants, le glutathion total a été dosé dans les cellules. Il s'agit d'un antioxydant qui assure un effet cytoprotecteur contre les espèces réactives. L'exposition aux plastifiants suggère l'induction d'un stress oxydant en raison de l'augmentation transitoire (à 48 heures ; DEHP et DINP) ou prolongée (dès 48 heures ; mélange des plastifiants) du glutathion, pour les expositions continues uniquement.

Au regard de ces perturbations, le statut énergétique a été évalué par le ratio ATP/ADP. Il s'agit d'un marqueur reflétant le fonctionnement cellulaire. Une diminution tardive de ce ratio a été observée à 72 heures pour le mélange uniquement. La respiration mitochondriale a été évaluée car elle est une source d'énergie cellulaire grâce à la production d'ATP par la phosphorylation oxydative. La mitochondrie est une cible de la toxicité des plastifiants car une diminution de la consommation mitochondriale d'oxygène a été observée de manière marquée dès 3 heures (DEHP), à 24 heures (mélange) et à 48 heures (DINP). La non-superposition des effets au cours du temps suggère la mise en place d'un mécanisme d'adaptation. En effet, en agrégeant l'ensemble des résultats, l'exposition aux plastifiants entraîne un stress cellulaire, ciblant la respiration mitochondriale et se traduirait par un changement métabolique. De plus, la cytotoxicité endothéliale rapide et marquée du DEHP n'est pas similaire à l'effet du mélange, car avec un effet différé dans le temps. Ainsi, les résultats de cette étude apportent de nouvelles informations concernant les effets des plastifiants en mélange au niveau endothélial.

Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont montré que les plastifiants induisent une cytotoxicité au niveau endothélial. Cela a été observé pour toutes les conditions testées, à l'exception du DEHT. Cette étude apporte de nouvelles données concernant la toxicité endothéliale liée à un effet mélange. L'évaluation de la respiration mitochondriale a montré que la mitochondrie est une cible de leur toxicité puisqu'une diminution marquée de la consommation d'oxygène, associée à une augmentation du métabolisme glycolytique anaérobie, a été observée. Toutefois, les effets marqués sur les fonctions cellulaires ont été observés de manière différée, révélant la capacité d'adaptation des cellules endothéliales en réponse au stress induit par l'exposition aux plastifiants. Un mécanisme d'adaptation lié aux voies métaboliques participerait au maintien des fonctions cellulaires.

Effects of DEHP, DEHT and DINP alone or in a mixture on cell viability and mitochondrial metabolism of endothelial cells *in vitro*

Kelly Poitou, Tiphaine Rogez-Florent, Anaïs Dirninger, Cécile Corbière, Christelle Monteil

Normandie University ; UNIROUEN, UNICAEN, ABTE, 76000 Rouen, France

* Correspondence: christelle.monteil@univ-rouen.fr

Abstract

Plasticizers are chemicals of high demand used in a wide range of commercial products. Human exposure occurs through multiple pathways from numerous sources and to multiple plasticizers. This is a matter of particular concern as it may contribute to adverse health effects. The vascular system carries plasticizers throughout the body and therefore can interact with the endothelium. The aim of the study was to evaluate the *in vitro* toxicity on endothelial cells by considering the individual and the mixture effects of three plasticizers of interest: di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), diisononylphthalate (DINP) or di-(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHT). In this study, their cytotoxicity on HMEC-1 cells was assessed by evaluating cell function (viability, cell counting, total glutathione and intracellular adenosines) and mitochondrial function (mitochondrial respiration). Results showed cellular physiological perturbations induced with all the condition tested, excepted for DEHT. Plasticizers induced a cytotoxicity by targeting the mitochondrial respiration with a depletion of mitochondrial ATP production and an increased in glycolytic metabolism, which occurred earlier for DEHP compared to DINP and the mixture. Additionally, delayed effects were observed between the cellular and the mitochondrial parameters. These results suggest that endothelial cell could go through a metabolic adaptation to face plasticizer-induced cellular stress, leading to rapid changes to maintain their cellular processes effective. To conclude, this study provides additional information on the adverse effects of plasticizers on endothelial cells.

Introduction

With a global consumption reaching 7.5 million tons annually, plasticizers are chemicals of high demand (1). Plasticizers are chemical additives of low molecular weight. These compounds are used to soften and to increase the flexibility of plastic materials (2). Their uses broaden over time to meet the growing industrial demand to the extent that plasticizers are ubiquitous part of contemporary lifestyle. They have been reported in a wide range of commercial products such as food packaging, toys, medical

devices as well as protective gloves (3–6). Although plasticizers consumption is tremendous, their use is not without risks.

Plasticizers can leach out during product use because they are not covalently bound. Thus, plasticizer leaching from products is at risk of exposure although this is unintentional. Human exposure can occur through multiple pathways of exposure including oral, respiratory, dermal and parenteral routes (7–10). This is a matter of particular concern because human exposure to plasticizers has been related to adverse health effects. Many epidemiological and experimental studies have focused on evaluating their reproductive disorders (11–20). Lately, studies have reported the association between exposure to plasticizers and cardiovascular risk factors (e.g., high blood pressure, arrhythmias, atherosclerosis) (21). More recently, cardiovascular mortality was attributed to phthalate exposure (22). However, investigation on the toxicological effects of plasticizers on the cardiovascular system remain limited, particularly considering that various medical devices containing high plasticizers content can exposed the circulatory system (9,23,24).

Among the few studies conducted on the circulatory system, bis-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is by far the most studied plasticizer even though the diversity of plasticizers on the market is consequent. DEHP showed to induce vascular injury in orally exposed C57/BL6 mice through alterations in vascular tone (25). Moreover, DEHP contributed to inflammation by increasing the serum level of pro-inflammatory cytokines in ApoE^{-/-} mice and in human umbilical vein endothelial cells (26,27). Vascular damage induced by plasticizers could also be mediated by oxidative stress on endothelial cells as seen with the increasing level of reactive oxygen species (ROS) in EA.hy926 cells exposed to mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), the main metabolite of DEHP (28,29). Inflammation and oxidative stress are two mechanisms that are plausible contributors of atherosclerosis. DEHP-promoted atherosclerosis was reported in intraperitoneally exposed ApoE^{-/-} mice through LDL oxidation within the arterial wall and macrophage infiltrations along with the disruption of lipid metabolism (26). Altogether, the above-mentioned results lead to think that exposure to plasticizers could mediate endothelial cell dysfunction. Indeed, DEHP exposure modified the expression of adhesion molecules in ApoE^{-/-} mice and in human umbilical vein endothelial cells (26,27). Besides, endothelial cell injury was observed *in vitro* following DEHP exposure with imbalance of antioxidant status (28,30). Endothelial dysfunction could be related to mitochondrial alteration, as it is a well-known target of oxidative stress (31). The effects of plasticizers on the mitochondria were mostly studied considering the mechanism of cell death with mitochondrial outer membrane permeabilization (28,30,32). However, the mitochondrial energetic status following a cellular stress induced by plasticizers remain limited despite its crucial role for cell functions.

Furthermore, most toxicological studies are not representative of real-life exposure. On the one hand, plasticizers have mostly been evaluated individually although human biomonitoring studies have emphasized that populations are exposed to a mixture of plasticizers (33,34). Hence, the effects of individual plasticizers is possibly modified when in mixture because chemicals can interact with each

other as revealed with the cumulative effect of a mixture of five anti-androgenic phthalates on the reproductive tract development in male rats (35). Yet, the exposure to multiple plasticizers is rarely taken into account apart from the reproductive system (36–38). On the other hand, the REACH legislation framework has initiated the replacement of classified phthalates (DEHP, benzyl butyl phthalate, diisobutyl phthalate, dibutyl phthalate, dipropyl phthalate and dicyclohexyl phthalate) by alternative plasticizers such as long-chain phthalates (e.g., diisononyl phthalate (DINP)) and non-phthalate plasticizers (e.g., bis-(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHT)) (34,39). However, the substitution of plasticizers does not necessarily ensure absence of toxicity. To exemplify, DINP promoted hypertension in C57/BL6 mice following oral exposure by contributing to vascular endothelial dysfunction through a decrease of both endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production (40).

Experimental data on the effects of plasticizer mixture on the vascular system are scarce even though it is a known target of the plasticizers. To our knowledge, only a recent *in vivo* study was conducted to investigate the effects of plasticizer mixture on the vascular system (41). However, it investigated the blood-brain barrier, not the peripheral vasculature. Thus, it is necessary to fill remaining gaps because all the above-mentioned detrimental effects of plasticizers on the vascular system encourage us to think that direct exposure to plasticizers could result in endothelial dysfunction through an oxidative mechanism or a mitochondrial impairment. To overcome this knowledge gap, this work aimed to assess *in vitro* the toxicological effects of three representative plasticizers, alone and in a mixture, on a human microvascular endothelial cell line (HMEC-1) by cell viability, total intracellular glutathione, intracellular adenosines and mitochondrial function. The three plasticizers selected included DEHP a well-known reproductive toxicant along with two alternative plasticizers, respectively DINP and DEHT, as they constitute a representative group of the most used plasticizers while also including traditional and alternative plasticizers (42–44).

Materials and methods

1. Human microvascular endothelial cell line (HMEC-1) culture

HMEC-1 cell line was provided by American Type Culture Collection (ATCC[®], CRL-3243[™]). These cells are human microvascular endothelial cells which were immortalized by transfection with the simian virus 40. This cell line features non pathological phenotype with applications for *in vitro* toxicological studies (45,46). HMEC-1 cells were cultured in MCDB 131 medium (Gibco, Fisher Scientific, Illkirch, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 mM L-glutamine, 10 ng/ml recombinant human epidermal growth factor (EGF), 10 U/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin (Gibco), and with 1 µg/ml hydrocortisone obtained from Sigma-Aldrich (Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France). Cells were grown in culture flasks purchased from BD Falcon (Corning, New York, USA) and were incubated with 5% CO₂ at 37°C. At confluency, cells were rinsed with

Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) and cell passage was operated using 0.05% trypsin-EDTA (Gibco). Cells were counted after a dilution in 0.1% trypan blue solution (Sigma-Aldrich). For the experiments, cells were seeded in either 96-well, 6-well microplates (BD Falcon) or 24-well microplates (Seahorse, Agilent Technologies, Santa-Clara, USA).

2. Studied plasticizers

The three plasticizers are all purchased from Sigma-Aldrich and included DEHP (CAS number 117-81-7), DEHT (CAS number 6422-86-2) and DINP (CAS number 28553-12-0) (**Fig. 1**). DEHP is a well-recognized regulated plasticizer due to its reproductive toxicity (category 1 H360). DEHT and DINP are two alternative plasticizers to DEHP because they are considered of lower toxicity. These three plasticizers were selected based upon previous experiments carried out in our laboratory (6).

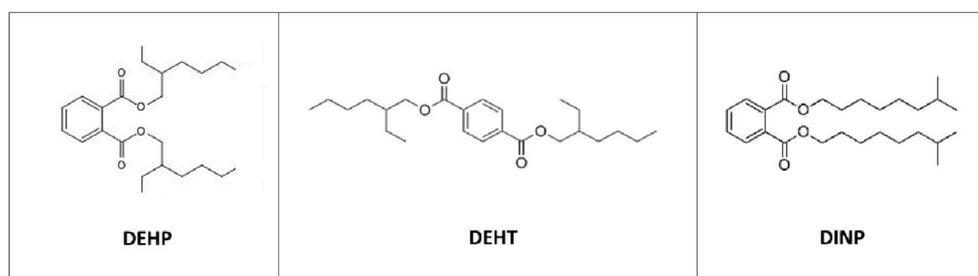


Figure 1 : Topological structure of the studied plasticizers

3. Solution preparations

For each plasticizer, a stock solution was prepared by gravimetry at a concentration of 10 g/l in dimethyl sulfoxide (DMSO) obtained from Sigma-Aldrich. Intermediate solutions were prepared at a targeted concentration of 1 500 mg/l in DMSO for both plasticizers individually and in mixture. All treatment solutions (DEHP, DEHT, DINP and the mixture) were prepared extemporaneously by diluting intermediate solutions in MCDB medium at a final concentration of 15 mg/l with 1% DMSO for each condition. For the experiments, 1% DMSO was used as the solvent control.

4. Plasticizer treatments and exposure procedures on HMEC-1 cells

Cells were treated at a concentration of 15 mg/l for both plasticizers tested individually and in mixture (DEHP, DEHT and DINP). The tested concentration of 15 mg/l was determined in accordance with previous toxicological researches on the effects of plasticizers on the cardiovascular system (30,47). Since DMSO and the culture medium differ by their polarity, their solubility was checked beforehand in order to obtain homogeneous solutions. Cell treatments were practically feasible at the chosen concentration because no precipitation occurred during the preparation of the treatment solutions. The studied plasticizers were tested on cells following two distinctive exposure procedures to evaluate respectively continuously and repeated exposures for the following toxicological endpoints i.e.,

the cell viability, the total intracellular glutathione (total glutathione) content and cellular adenosine amounts. As for mitochondrial metabolism, it was determined following continuous exposures solely. For continuously exposures, cells were constantly exposed with each treatment solutions during all the experiment with exposure times ranging from 24 hours to 72 hours. For repeated exposures, cells were intermittently exposed with exposure time of three hours a day with each condition (from J1 to J3). Exposures were then stopped by removing the treatment solutions and by replacing it by fresh culture medium until the following exposure.

5. Evaluation of toxicological endpoints in HMEC-1 cells

All reagents used were provided by Sigma-Aldrich except the following chemicals: ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was obtained from Prolabo (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), β -Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (NADPH) was provided by Roche (Mannheim, Germany), sodium potassium tartrate tetrahydrate was purchased from Carlo-Erba (Val-de-Reuil, France) and, hydrochloric acid and sodium hydroxide were obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Bradford reagent was provided respectively by Bio-Rad (Hercules, USA). Ultra-pure water was supplied by a water purification system from ELGA LabWater (Veolia, Saint-Maurice, France). XF Cell Mito Stress assay was obtained from Seahorse (Agilent Technologies, Santa-Clara, USA).

6. Cell viability

For the evaluation of the cell viability, HMEC-1 cells were seeded in 96-well microplates at a density of 2.0×10^4 cells/well in 100 μ l of culture medium. Cells were treated at confluency with 100 μ l of each treatment solution after removing the culture medium in each well. Cell viability was assessed by spectrophotometry using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. At the end of each exposure time, 10 μ l of a MTT solution (5 mg/ml prepared in D-PBS) was added to each well. After three hours of incubation away from light, 100 μ l of a sodium dodecyl sulfate solution (10% prepared in 0.01N hydrochloric acid) were put in each well to dissolve reduced formazan crystals and microplates were then incubated overnight. The following day, absorbance measurements were performed at 570 nm using a microplate reader (SAFAS Xenius, SAFAS Monaco, Monaco). For each treatment group, the mean of absorbance of all the wells was calculated. Cell viability is expressed as relative percentage to the solvent control (DMSO 1%) which was standardized at 100%.

7. Cell counting

For cell counting, HMEC-1 cells were seeded in 6-well microplates at a density of 4.0×10^5 cells/well in 2 ml of culture medium. At confluency, the culture medium was removed and cells were treated with 2 ml of each treatment solution. Cell counting was based on the trypan blue exclusion method following respectively 24, 48 and 72 hours of exposure. For each treatment group, cells were

counted after a dilution in 0.1% trypan blue solution, using Malassez cell. Cell counting results are expressed in percentage of viable cells.

8. Total intracellular glutathione content

For the evaluation of total intracellular glutathione content, HMEC-1 cells were seeded in 6-well microplates at a density of 4.5×10^5 cells/well in 2 ml of culture medium. Then, culture medium was removed either at confluency (for continuously exposures) or at sub-confluency (for repeated exposures) and cells were treated with 2 ml of each treatment solution. A two-step extraction with perchloric acid (PCA) obtained from Prolabo (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) was conducted. Into each well, 500 μ l (an aqueous PCA solution 1N) were added and cells extracts were collected with a cell scraper. For each sample, the solution was collected in the microtube and was centrifugated at 4°C (13,500 g for 5 minutes). Cell protein pellet was collected and resuspended in sodium hydroxide (an aqueous NaOH solution 1N) for protein assay. The supernatant was neutralized with an equal volume of carbonate of potassium (an aqueous K₂CO₃ solution 2M) (Sigma-Aldrich) and was centrifugated at 4°C (13,500 g for 5 minutes). The evaluation of total intracellular glutathione content in cells following plasticizers exposures was performed using enzymatic recycling method with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) reagent in a 96-well microplate. A volume of 10 μ l of sample was added along with 30 μ l of a phosphate buffer solution pH 7.4 (143 mM NaH₂PO₄ and 6.31 mM EDTA prepared in ultrapure water) and 200 μ l of reactive buffer prepared in phosphate buffer solution (0.31 mg/ml DTNB and 0.23 mg/ml NADPH). A volume of 40 μ l of 8.5 U/ml glutathione reductase was added briefly before evaluating enzymatic kinetic by measuring TNB formation at 405 nm during 2 min 40 s with a microplate reader (Tecan Spark®, Männedorf, Switzerland). For each treatment group, the content of total intracellular glutathione was normalized to the protein amount of the corresponding sample (Lowry protein assay) and it was standardized with the solvent control (DMSO 1%).

9. Intracellular adenosine amounts

Intracellular adenosine amounts (ATP, ADP and AMP respectively) were measured on the supernatant of the cellular extract after PCA extraction as described above. The quantification of cellular adenosines was made using a high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector (HPLC-DAD) method previously developed and validated in our laboratory for the simultaneous determination of ATP, ADP and AMP in biological samples (48). Analyses were performed using the 1260 Infinity II LC System (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Chromatographic separation was achieved on a Poroshell 120 EC-C18 column (150 mm \times 3 mm, 2.7 μ m *i.d.*) with an EC-C18 guard (3 mm) both at 20°C. One microliter of each sample was injected. Adenosines were separated in isocratic elution consisting of 50 mM potassium hydrogen phosphate pH 6.80. The flow rate was kept at 0.6 ml/min. Detection of all three adenosines was performed at 254 nm. Data were processed using OpenLab CDS LC ChemStation software (Agilent). The concentrations of

intracellular adenosines in samples were determined using calibration curve obtained with the standard solutions (0.2—10 μ M respectively for ATP, ADP and AMP). Each adenosine concentration was normalized to the amount of protein of the corresponding sample and it was expressed in nmol/mg of protein. For each treatment group, the ATP/ADP ratio was determined, and it was standardized with the solvent control (DMSO 1%).

10. Cell metabolism assays

Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were measured using a Seahorse XF24 extracellular flux analyzer (Agilent technologies), according to the manufacturer's instructions. Cells were seeded in XF24 culture microplates for 96 hours before the measurements in order to allow the cells exposures to plasticizers in function of time (3h, 24h or 48h). The optimum number of cells/well was determined to be 25,000 cells/well. After the different exposures, the cells are then washed free of the plasticizers or solvent (DMSO 1%) and incubated with a phenol red-free DMEM-based medium supplemented with 10 mM Glucose, 1 mM pyruvate and 2 mM glutamine in a CO₂-free incubator for 60 min before the Seahorse assay. A stress test was performed with addition of oligomycin (8 μ g/mL) after the measurement of baseline OCR (3 cycles, 24 min), to inhibit the ATP synthase and estimate basal respiration coupled to ATP synthesis (3 cycles, 24 min). To determine the maximal OCR, 1 μ M carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) was injected (3 cycles, 24 min). Finally, a combination of antimycin A (AA, 2 μ g/mL) and rotenone (ROT, 5 μ M) was injected to inhibit electron flux (3 cycles, 24 min). Data analysis was conducted using Wave Software (Version 2.6.3.5; Agilent Technologies).

11. Statistical analyses

At least three independent experiments were carried out for each toxicological endpoint and each sample was analyzed in triplicate. Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 9.3.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). A non-parametric Mann-Whitney U-test was performed and differences with a p-value less than 0.05 were considered statistically significant (*: p <0.05, **: p <0.01, ***: p <0.001).

Results

1. Modification of the HMEC-1 cell viability following individual and combined plasticizer exposures

Cell viability was evaluated in human microvascular endothelial cells (HMEC-1) using MTT-spectrophotometric assay following exposures to DEHP, DEHT and DINP individually and combined, either continuously (**Fig. 2A**) or repeatedly (**Fig. 2B**).

Continuous exposures were conducted on confluent endothelial cells from 24 hours to 72 hours, at a concentration of 15 mg/l for each plasticizer for both individual and combined exposures. Results showed significant modifications of the cell viability in continuously exposed cells compared with the control group. First, an increase was observed at 24 hours of exposure for DEHP (121%), DINP (115%) and the mixture (120%). It was followed by a decreasing cell viability which was observed in a time-dependent manner for all the treatment groups, starting from 48 hours of exposure for DEHP (85 %) and DINP (91%), and from 72 hours of exposure for the mixture (60%). Cell viability was less affected by continuous exposure to DEHT.

For repeated exposures, cells were treated three hours per day, respectively during one (J1), two (J2) and three days (J3). Cells were exposed with a concentration of 15 mg/l for each plasticizer, for both individual and combined exposures. Between each treatment, plasticizer solutions were removed and replaced with fresh culture medium. For each repeated application, no significant changes of the cell viability were noticed in cells exposed either to DEHT or DINP compared to the control group. On the contrary, DEHP and the mixture displayed significant changes in comparison to the control group. Indeed, an increasing cell viability was reported with DEHP (mean values between 121 and 128%) like the mixture (mean values of 115%, except for J3 with a mean value of 107% at the limit of the significance level).

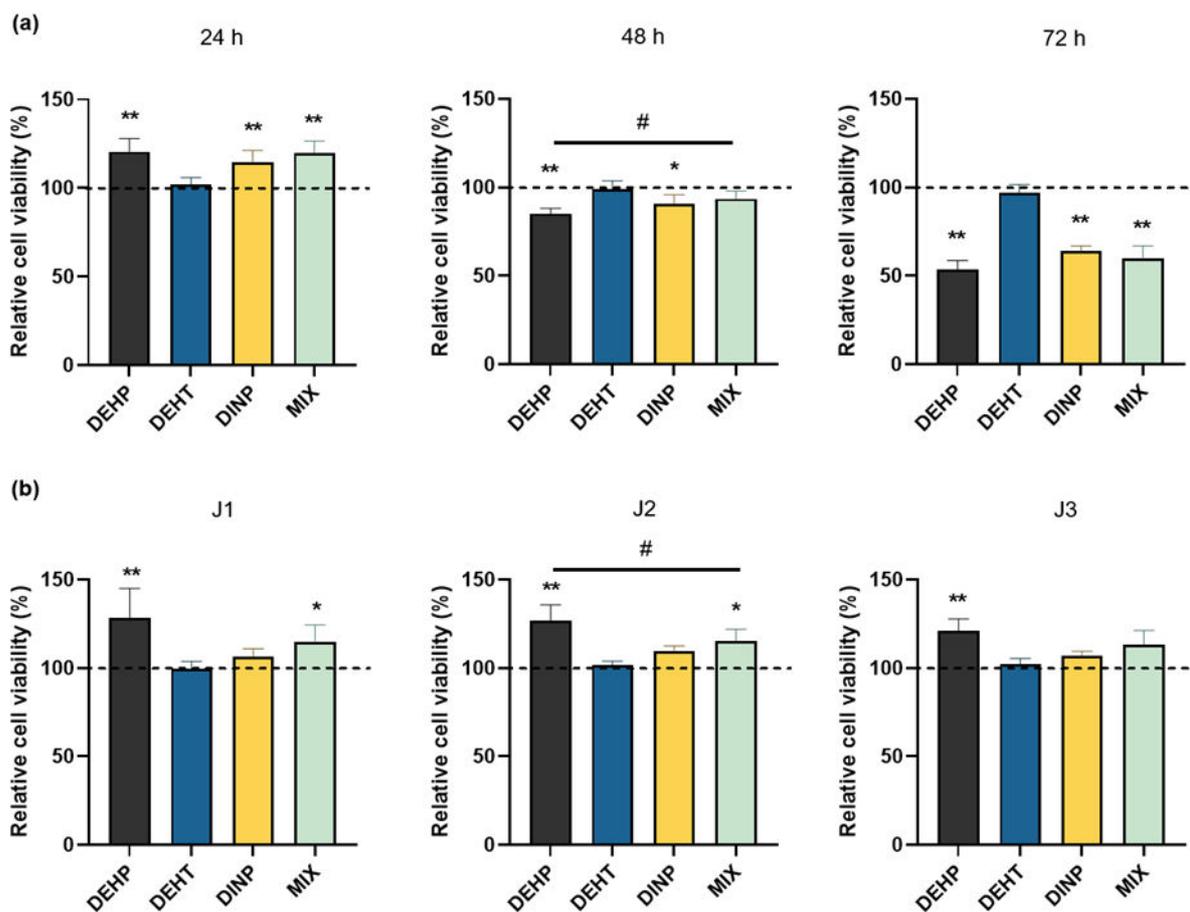


Figure 2 : Comparison of cell viability in HMEC-1 cells following exposures to DEHP, DEHT and DINP (individual and combined). (A) For continuous exposures, HMEC-1 cells were incubated from 24 hours to 72 hours with DEHP, DEHT, DINP and the mixture. (B) For repeated exposures, HMEC-1 cells were incubated three hours per day between one and three days with DEHP, DEHT, DINP and the mixture. Cell viability was measured by using MTT assay. For their comparison, results were normalized to the amount of protein to the corresponding sample and were standardized with the solvent control. Results are expressed as mean % \pm SD ($n \geq 5$), * $p < 0.05$ vs DMSO, ** $p < 0.01$ vs DMSO, # $p < 0.05$ vs MIX.

2. Effects of individual and combined plasticizer exposures on HMEC-1 cell counting

Cell counting is used to determine the number of living cells. Cell counting was performed using the trypan blue exclusion method following exposures to DEHP, DEHT, DINP and the mixture, respectively during 24, 48 and 72 hours (**Fig. 3**).

The results showed that the cell viability was not impaired following both 24 hours and 48 hours of exposure to the plasticizers for all the treatment groups compared to the solvent control. Cell viability differences were observed starting 72 hours of exposure. A reduced number of living cells was observed with exposures to DEHP, DINP and the mixture compared to the control group. On the contrary, DEHT did not significantly impair the number of living cells, regardless of the time of exposure.

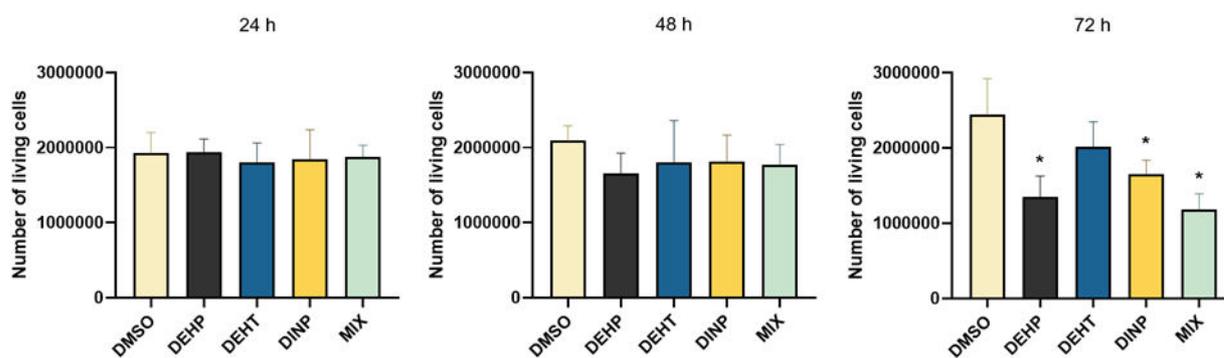


Figure 3 : Comparison of the number of living HMEC-1 cells following exposures to DEHP, DEHT and DINP (individual and combined). HMEC-1 cells were incubated from 24 hours to 72 hours with DEHP, DEHT, DINP and the mixture. Results are expressed as mean % \pm SD (n=4), *p < 0.05 vs DMSO.

3. Effects of individual and combined plasticizer exposures on the total intracellular glutathione in HMEC-1 cells

Glutathione has a protective function against reactive species. The level of total glutathione is a marker of cellular oxidative stress due to its antioxidant capacity. The content of total glutathione was quantified in HMEC-1 cellular extracts with spectrophotometric assay based on the reaction between GSH and the DTNB reagent following exposures to DEHP, DEHT and DINP individually and combined, either continuously (**Fig. 4A**) or repeatedly (**Fig. 4B**).

DEHT was the only plasticizer which did not show modifications on the content of total glutathione in cells for all treatment times (*versus* control group). For the other treatment groups, no significant differences were observed at the first tested time of 24 hours. The rise of the antioxidant capacity in HMEC-1 cells was induced later following 48 hours of exposure to DEHP, DINP and the mixture in comparison with the control group. The increasing content of total glutathione in cells was still observed following 72 hours of exposure to the mixture (mean ratio of 1.54) compared with the control group but it was reversed for cells exposed individually to both DEHP and DINP. Moreover, the effects of DEHP, DINP and the mixture on cells were all distinctives from DEHT at both 48 and 72 hours of exposure (**Fig. 4A**).

Considering the results of the content of total glutathione in cells repeatedly exposed to plasticizer(s) (**Fig. 4B**), no modifications were observed with any of the tested treatment groups, both individually and in mixture. It showed that the number of treatment repetitions had no effect on the content of total glutathione in cells exposed to the studied plasticizers regardless of the condition considered.

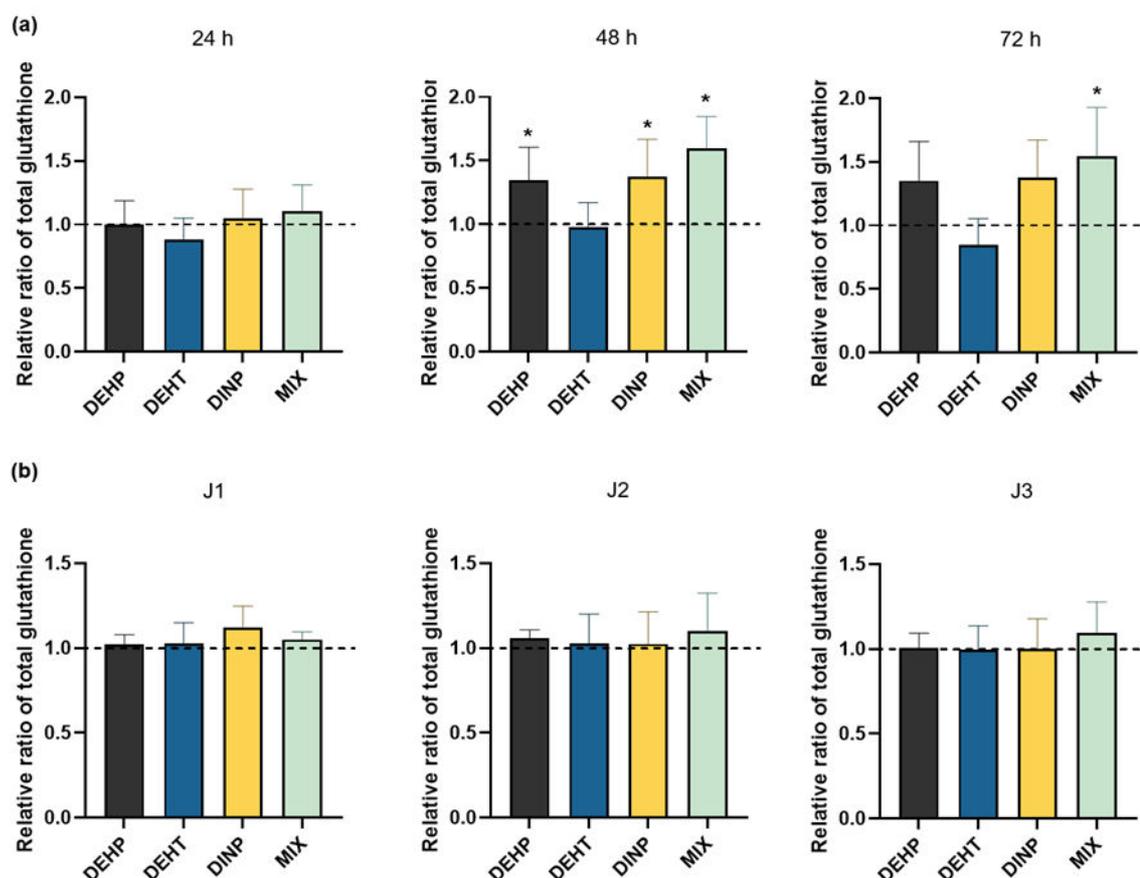


Figure 4 : Comparison of total glutathione content in HMEC-1 cells following exposures to DEHP, DEHT and DINP (individual and combined). (A) For continuous exposures, HMEC-1 cells were incubated from 24 hours to 72 hours with DEHP, DEHT, DINP and the mixture. (B) For repeated exposures, HMEC-1 cells were incubated three hours per day between one and three days with DEHP, DEHT, DINP and the mixture. For their comparison, results were normalized to the amount of protein to the corresponding sample and were standardized with the solvent control. Results are expressed as mean % \pm SD ($n \geq 6$), * $p < 0.05$ vs DMSO.

4. Effects of individual and combined plasticizer exposures on the amounts of intracellular adenosines in HMEC-1 cells

ATP is an important source of cellular energy. ATP is the core of physiological functions because it generates energy to cells through the cleavage of its phosphodiester bounds in ADP and AMP. The amounts of cellular adenosines were measured on HMEC-1 cellular extracts with HPLC-DAD following exposures to DEHP, DEHT and DINP individually and combined, either continuously (**Fig. 5A**) or repeatedly (**Fig. 5B**).

AMP was the only cellular adenosine which was not detected in the solvent control nor in the treatment groups, for both continuous and repeated exposure procedures. The results for the cellular adenosines are presented as the ratio of (ATP/ADP) of the treatment group standardized with the ratio of the solvent control at the same exposure time. For the results of continuously exposed cells to plasticizers, no effect

was observed on the ratio of cellular adenosines at both 24 hours and 48 hours of exposure for all treatment groups. At 72 hours of exposure, the cellular adenosines amounts were not modified in cells exposed to DEHP, DINP and DEHT individually compared to control group, contrary to the mixture. Indeed, the relative ratio of cellular adenosines dropped by half at 72 hours. Although cells exposed individually to DEHP showed no modifications in comparison with the control group, its relative ratio of cellular adenosines lowered (0.69) from 72 hours of exposure compared to DEHT, an isomer of position of DEHP. However, the decreasing was much less marked than that in combination with the other plasticizers tested.

Considering cells repeatedly exposed to the plasticizer(s) individually or in mixture, no modifications of the relative ratio of (ATP/ADP) were observed with any of the tested treatment groups. It showed that the number of treatment repetitions had no effect on the adenosine amounts in cells exposed to the studied plasticizers.

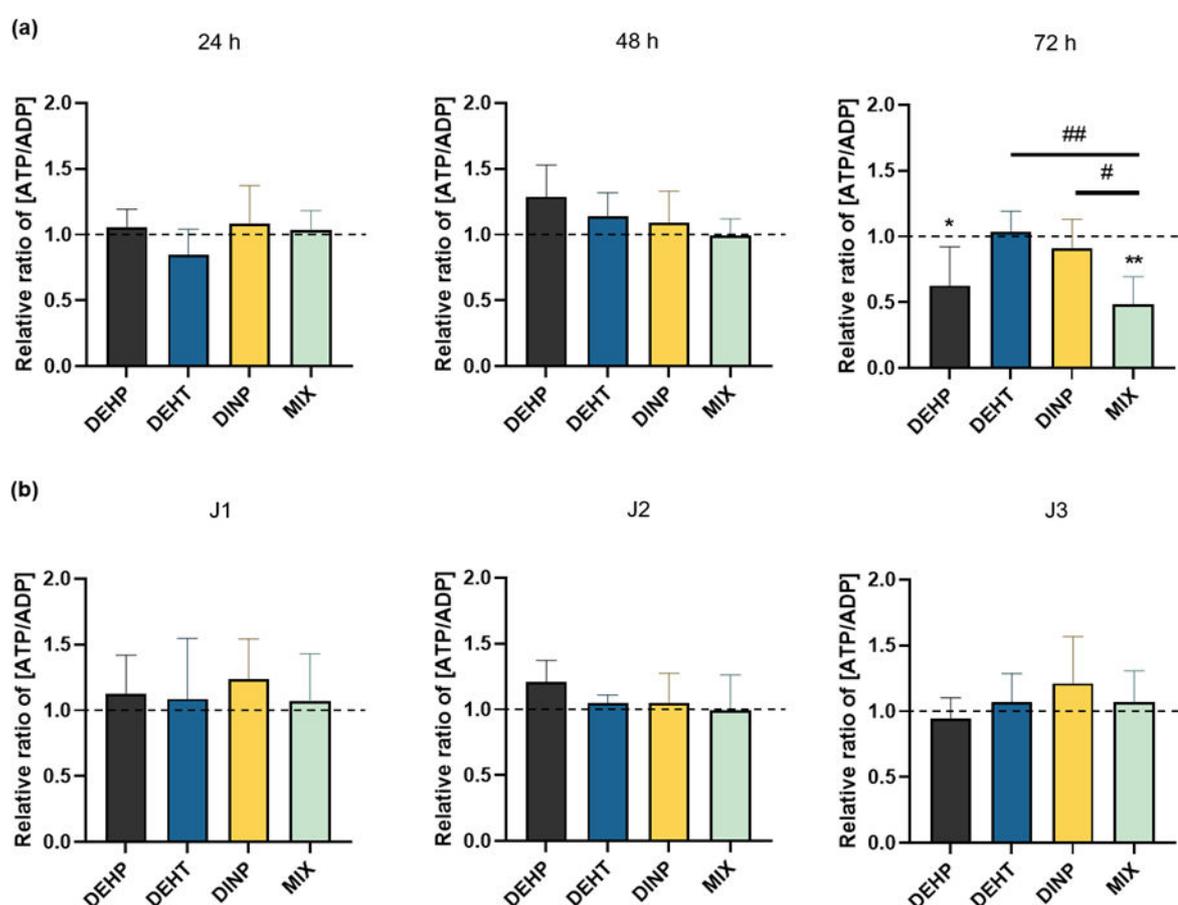


Figure 5 : Comparison of the relative ratio of ATP/ADP in HMEC-1 cells following exposures to DEHP, DEHT and DINP (individual and combined). (A) For continuous exposures, HMEC-1 cells were incubated from 24 hours to 72 hours with DEHP, DEHT, DINP and the mixture. (B) For repeated exposures, HMEC-1 cells were incubated three hours per day between one and three days with DEHP, DEHT, DINP and the mixture. Each concentration of ATP and ADP were normalized to the amount of protein of the corresponding sample before calculating the relative ratio ATP/ADP for each sample. For their comparison, the relative ratio was standardized with the one of the solvent control for each sample of all treatment groups. Results are expressed as mean % \pm SD ($n \geq 4$), ** $p < 0.01$ vs DMSO, # $p < 0.05$ vs MIX.

5. Measurements of mitochondrial function in HMEC-1 cells

To obtain a measurable OCR (a key parameter of oxidative phosphorylation) and ECAR (an indicator of glycolysis) after plasticizer exposures, we first determined the optimal number of cells, as shown in **Fig. 6**. OCR increased with cell number between 15,000 and 25,000 cells and remained roughly stable at densities of 25,000 to 30,000 cells.

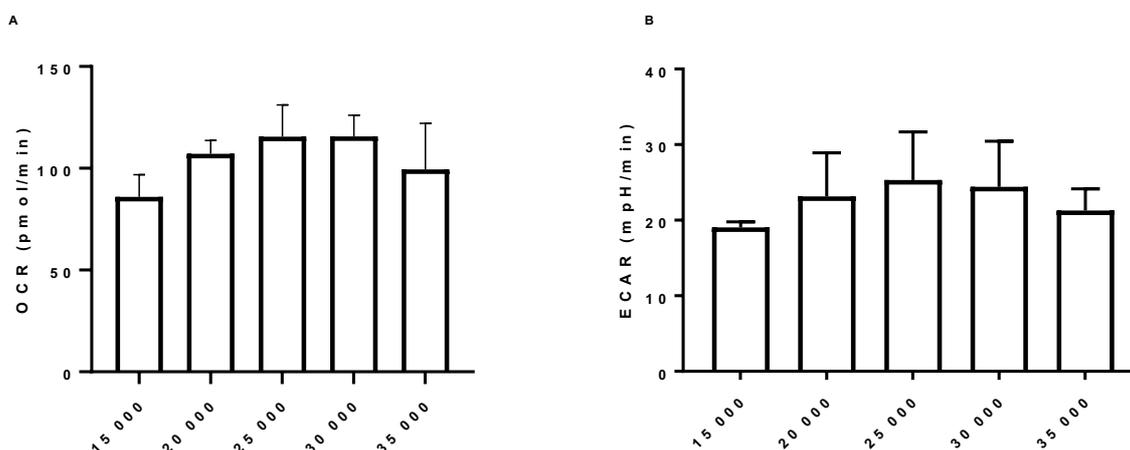


Figure 6 : Measurement of oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) as a function of cell seeding number. HMEC-1 were seeded into Seahorse plates 96h before the measurements of basal OCR (A) and ECAR (B). Data are the mean \pm SD, n=3-4 independent measurements.

For subsequent experiments, the seeding of 25,000 cells per well was selected. OCR for 25,000 cells was then measured under the basal condition followed by the sequential addition of oligomycin, FCCP and the combination of AA and ROT, as described in the material and methods. The AA and ROT-independent OCR allows to estimate the non-mitochondrial respiration and is subtracted from the other values (**Fig. 7A**). Oligomycin inhibits ATP synthase and allows the measurement of OCR linked to ATP synthesis. In these cells, ATP-linked oxygen consumption represents about 70% of the mitochondrial respiration. The maximal OCR was obtained after the addition of the ionophore FCCP to uncouple mitochondria and allow calculating the spare respiratory capacity, after subtracting the basal OCR. This parameter represents an assessment of the supplemental ATP that can be generated by oxidative phosphorylation under stressful conditions. These measurements indicate that the cells are normally functioning in these experimental conditions (**Fig. 7B**).

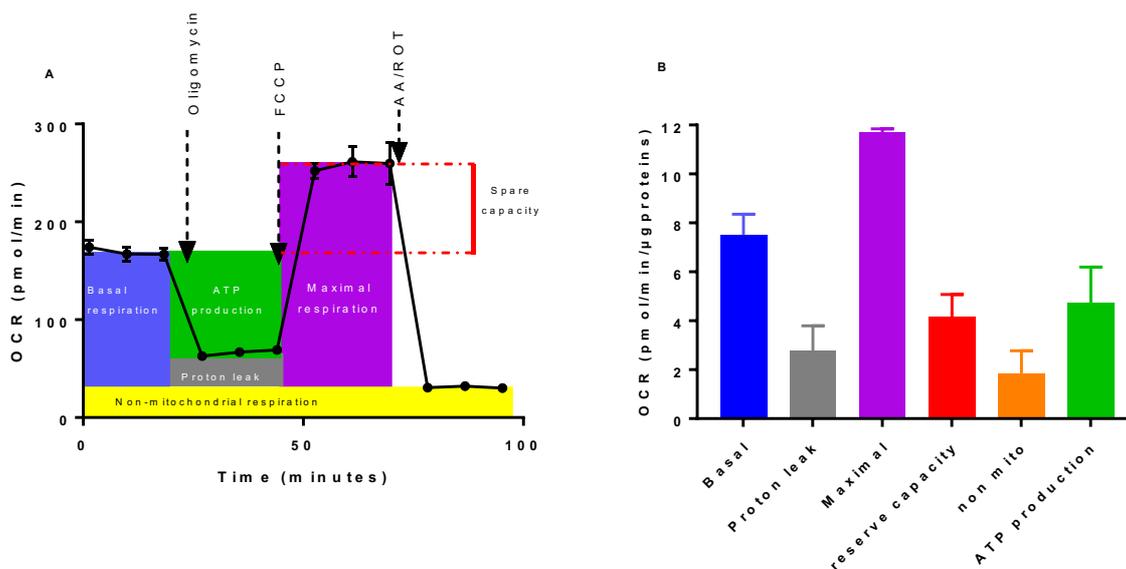


Figure 7 : Oxygen consumption rate (OCR) for 25,000 cells seeded 96h before the measurement of OCR and injection of inhibitors. (A) A representative diagram of time course for measurement of OCR in HMEC-1 cells and functional significance of area under curve. (B) The contribution of each of these parameters are calculated after normalization to proteins amounts and the means \pm SD from 3 independent measurements are plotted.

6. Effects of plasticizers on mitochondrial function

HMEC-1 cells were exposed 24 or 48 hours with the plasticizers before injection of oligomycin, FCCP and AA/ROT as described above. After 24 hours, only DEHP-treated cells exhibited a change in energy metabolism, with a drastic decrease of basal OCR, a decreased maximal respiration and declined reserve capacity, and reduced ATP production (**Table 1**). These observations were similar in mix-treated cells. After 48 hours, these changes were exacerbated following DEHP exposure. Decreased basal OCR, reserve capacity and ATP production were also observed after DINP exposure, although the decreasing magnitudes were smaller than those observed with DEHP. We also observed a decrease of non-mitochondrial OCR after 48 hours of exposure to DINP. The combination of plasticizers did not amplify the observed response with DEHP alone.

The alteration in energy metabolism observed after 24 and 48 hours of DEHP exposure was observed as early as 3 hours of incubation (**Fig. 8A**) and was associated with an increase in acidification, whatever the time of exposure (**Fig. 8B**).

Table 1 : Effects of plasticizers on mitochondrial function

		Control	DEHP	DEHT	DINP	Mix
Basal	24h	8.4 ± 0.9	4.8 ± 0.5*	9.8 ± 1.0	6.8 ± 1.1	5.4 ± 0.6*
	48h	7.5 ± 1.6	3.5 ± 0.7**#	8.8 ± 2.6	5.2 ± 0.6**\$	3.8 ± 1.2*
Proton leak.	24h	2.3 ± 0.5	1.9 ± 0.2	2.5 ± 0.3	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.4
	48h	2.0 ± 0.5	1.7 ± 0.4	2.3 ± 0.7	1.7 ± 0.3	1.4 ± 0.4
Maximal	24h	13.3 ± 1.9	6.8 ± 0.9*	15.2 ± 1.1	10.6 ± 1.7	7.8 ± 0.7*
	48h	12.6 ± 3.2	4.8 ± 0.7**#	12.4 ± 1.6	7.8 ± 0.8**	5.1 ± 1.5*
Reserve capacity	24h	5.0 ± 1.1	2.1 ± 0.7*	5.4 ± 0.7	3.8 ± 1.2	2.4 ± 0.4*
	48h	5.1 ± 1.6	1.3 ± 0.2**	5.6 ± 2.2	2.6 ± 0.6**\$	1.3 ± 0.3*
Non-mito.	24h	2.0 ± 0.5	1.4 ± 0.6	2.0 ± 1.0	1.6 ± 0.8	1.6 ± 0.8
	48h	1.6 ± 0.4	1.4 ± 1.1	1.6 ± 0.4	0.9 ± 0.2**	0.9 ± 0.2*
ATP prod.	24h	6.1 ± 0.8	2.6 ± 0.9*	7.3 ± 1.0	4.9 ± 1.1	3.5 ± 0.8*
	48h	5.5 ± 1.2	1.8 ± 0.6**	6.6 ± 2.0	3.5 ± 0.6**\$	2.4 ± 0.8*

The values represent means ± SD of 4 independent measurements. *p<0.05 vs. DMSO; #p<0.05 24h vs. 48h; \$p<0.05 DEHP vs. DINP.

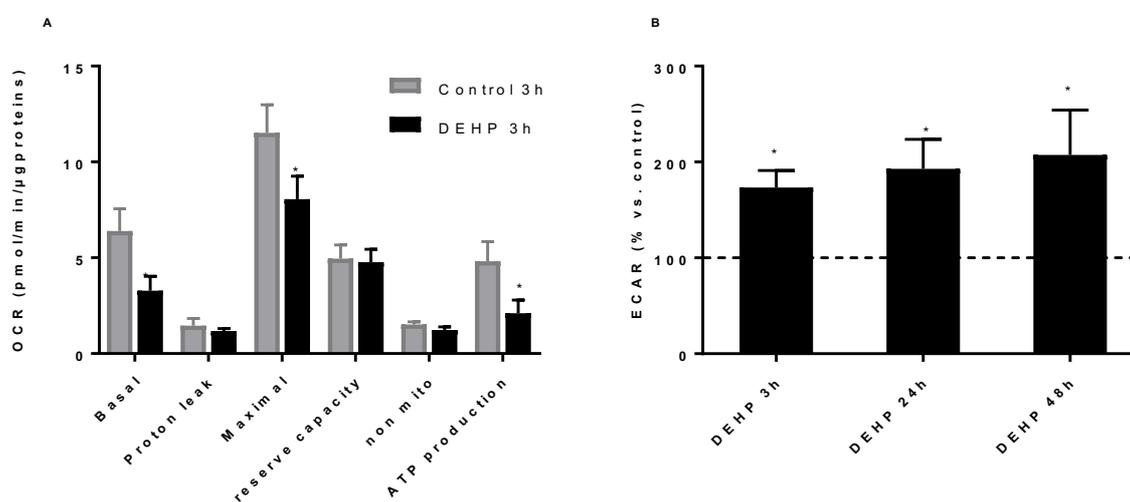


Figure 8 : Effect of DEHP on OCR and ECAR. (A) OCR measurements after 3 hours of exposure to DEHP compared to vehicle controls. (B) ECAR measurement after 3, 24 or 48 hours of exposure to DEHP. *p<0.05 vs. vehicle controls.

Discussion

Exposure to DEHP has been documented to be a risk factor for cardiovascular diseases (25,26,49). Although, endothelial cells are directly exposed to circulating plasticizers, few studies have evaluated the endothelial toxicity of plasticizers and, to a lesser extent mixture effects (28,30,32,41,50). Considering that DEHP regulation paved the way to its substitution with other plasticizers such as DINP and DEHT, it is necessary to evaluate their effects on the vascular system owing to the lack of data. Therefore, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* endothelial toxicity of DEHP, DINP and DEHT, both individually and all mixed together. Each plasticizer was at a concentration of 15 mg/l in all the solution tested, which corresponds to about 40 μM per plasticizer.

In this study, the more pronounced effects of plasticizers were observed with continuous exposures as depicted with cell viability measurements. Unexpectedly, an increase of cell viability for DEHP, DINP and the mixture of plasticizers was observed following 24 hours of exposure, which preceded a subsequent decrease in a time-dependent manner. In the literature, comparable conditions of time and concentration resulted in a diminishing cell viability as reported on vascular endothelial cells exposed to MEHP, the main metabolite of DEHP, in HUVEC (from 12.5 μM) and in EA.hy926 (from 100 μM MEHP) (28,30,32). On the other hand, it is of interest to note that an increasing cell viability trend was reported on a non-endothelial cellular model for DEHP (250 μM) and DINP (62.5 μM), tested separately, on a hepatocarcinoma cell line at an exposure time of 24 hours (51). Overall, the time-dependent decrease observed in our study for DEHP and DINP was in line with this same study, with more marked effects at 72 hours comparatively to 48 hours of exposure (51). Cell viability could be explained by cell proliferation as its decreased was reported for DEHP on human corneal endothelial cells with tested concentrations higher than those in the current study (from 100 μM) (52). Based on our results, it is not possible to determine whether viability alterations are a consequence of cell division capacity. However, MTT assay does not necessarily reflect cell viability, it could also be related to a metabolic and mitochondrial reprogramming induced by a stress as it has been described to contribute to MTT cellular reduction (53). Among the two DEHP substitutes, only DEHT showed no alteration on cell viability, which is in agreement with a study conducted on fibroblast cell line testing higher concentrations (0.01-0.1 mg/ml) (54). The results obtained with repeated exposures surprisingly did not worsen cell viability as it could be expected. Quite comparable results were obtained regardless of the number of repeated exposures. One plausible hypothesis is that intermittent incubation of cells with the plasticizers with the renewal of the culture medium interrupts cell exposure between each treatment period and therefore may enable cell to recover.

By comparing cell counting and cell viability, results did not show corresponding effects between these parameters. The increasing cell viability measured with MTT assay following 24 hours of exposure was not observed on cell counting. As results are inconsistent, it supports the hypothesis that plasticizers induced a metabolic and mitochondrial reprogramming in HMEC-1 cells rather than a

cellular proliferation. By taking this into consideration, it could be presuming that renewal of the culture medium does not result in cellular metabolic perturbations due to the absence of effects with the MTT assay with the repeated exposures.

It is of interest to note that cell viability indirectly reflects plasticizer-induced cytotoxicity, and so our results could be explained by cellular physiological perturbations as redox imbalance has been reported in plasticizer-induced cardiovascular pathogenesis (21). Glutathione is an endogenous antioxidant which plays a role in cytoprotection. In the present study, for repeated exposures, there was no distinction between the tested conditions nor between the number of exposures on the total glutathione content. Impairments were noted in the present study with continuous exposures. While a transient increase of the total glutathione content occurred at 48 hours of exposure for DEHP and DINP (both individually), a steady rise was observed up to 72 hours of exposure when all-three plasticizers are in mixture. It demonstrates that plasticizers displayed different cytotoxicity when they are mixed by inducing modifications of the glutathione content. Altogether, these results reflect a cellular stress caused by plasticizers which could result from the production of reactive species. In this regard, it would be interesting to distinguish which glutathione form contributes to the elevation of the total glutathione content, and so determining the ratio of reduced form (GSH) to oxidized form (GSSG) can be a useful indicator. Previous experimental studies described for instance a GSH depletion in HUVEC along with an increased ROS production following 24 hours of exposure to MEHP (about 20 μ M) (30,55).

The implication of ROS in vascular diseases have been previously claimed and results underlined that endothelial mitochondria are a target of the deleterious effects of ROS. The loss of the potential mitochondrial membrane was depicted by several *in vitro* studies which showed plasticizer-induced ROS production in endothelial cells (28,30,32). Despite this, data on the effects of plasticizers on the mitochondrial respiration are scarce. That is why the mitochondrial respiration was assessed in the current study to further understand how plasticizers could impair this function, using a Seahorse metabolic flux assay to evaluate oxygen consumption rates and extracellular acidification rates. It was decided to focus on continuously exposed endothelial cells owing to the noticeable cytotoxicity comparatively to the repeated exposures. As far as we know, this is the first study which measures mitochondrial respiration following plasticizers exposures on vascular endothelial cells. Altogether, results showed an alteration of the mitochondrial function excepted for DEHT, which supports its non-cytotoxicity on endothelial cells. The mixture and DEHP present comparable effects on the mitochondrial respiration which led us to think of its main contribution in the mixture effects, or at least more than DINP. Overall, plasticizers exposures represent a stressful condition for mitochondria with the disruption of both basal and reserve capacity. As seen with the decrease of mitochondrial ATP production, mitochondria seem not to be able to face energy demand when exposed to DEHP, DINP and the mixture. The mitochondrial respiration decreased as early as 24 hours for the DEHP and the mixture and lowered between 24 and 48 hours for the DEHP only. Beyond 48 hours, its effects were not assessed due to the observation of cell detachment at 72 hours of exposure which is in line with the drop

of the cell viability previously described. The early mitochondrial ATP depletion for the DEHP and the mixture was not consistent with the effects observed for the ATP/ADP ratio which declined on a later stage at 72 hours of exposure and with the mixture only. These results strengthen the hypothesis of a plasticizer-induced metabolic reprogramming because mitochondrial ATP production and ATP/ADP ratio declined in a delayed-time manner. This hypothesis is strengthened by the increase in acidification rate, which reflects a shift towards an anaerobic glycolytic metabolism.

Impairment of the oxidative phosphorylation was previously described on skeletal muscle cells exposed to MEHP, the authors reported a degradation of the complex I, which was triggered by ROS production (56). However, in the present study redox imbalance was found subsequently to the mitochondrial respiration alteration that is why it does not seem to be a relevant explanation in this case. The short-term effect of DEHP on mitochondrial respiration has not yet been evaluated to our knowledge. In the present study, results of a short-term exposure provide additional information. Indeed, the sudden mitochondrial ATP depletion occurred as early as three hours of exposure with DEHP. Interestingly, it did not directly affect cellular physiological functions when comparing the first three hours of the repeated exposures as no modifications were noted. Considering these kinetic effects, it reinforces the idea that endothelial cells are not only capable to adapt to cellular stress induced by plasticizers but also are quickly responsive. It is likely to believe that this adaptation goes through metabolic pathways, leading to rapid changes to maintain effective the cellular processes. By gathering data from the literature on endothelial cell metabolism in vascular diseases (angiogenesis and atherosclerosis), studies revealed their adaptable cell metabolism (57,58). Physiologically, glycolysis and mitochondrial respiration are necessary for HUVEC proliferation (59). However, a metabolic shift in endothelial cells in favor of fatty acid oxidation and/or glycolysis occurred during cardiovascular pathogenesis in response to endogenous signals, oxidized LDL and angiogenic factors (57,58).

By analogy, an endothelial metabolic shift caused by circulating plasticizers in blood could be presumed because the dysfunctional mitochondrial respiration was combined with an increased acidification, supporting a possible shift to anaerobic metabolism resulting in lactate production. In the metabolic shift observed during angiogenesis and atherosclerosis, the implication of PPAR and oxidative stress was proposed (58,60). Considering that plasticizers are known as PPAR ligands as well as oxidative stress inductors, their implication in the metabolic shift might be plausible in endothelial cytotoxicity (30,47,61). However, based on our results, it is not possible to determine the cause of the mitochondrial dysfunction because it was not investigated. Hence, further experiments are needed to confront these hypotheses.

Conclusion

In summary, the present study showed that plasticizers induced an endothelial dysfunction by targeting the mitochondrial respiration with a depletion of ATP production, which occurred earlier for DEHP compared to DINP and the mixture. On the contrary, DEHT did not show any cytotoxicity. According to the delayed effects between the cellular and the mitochondrial parameters, these results suggest that a mechanism of adaptation takes place in endothelial cell to face plasticizer-induced cellular stress, leading to metabolic reprogramming to maintain their cellular processes effective. To conclude, this study provides additional information on the adverse effects of plasticizers on endothelial cells.

References

1. Plasticisers [Internet]. Plasticisers - Information Center. [cité 20 août 2021]. Disponible sur: <https://www.plasticisers.org/plasticisers/>
2. Krauskopf L, Godwin A. Chapter 5: Plasticizers. In: PVC Handbook. Munich: Hanser Publishers; 2005.
3. Petersen JH, Jensen LK. Phthalates in soft PVC products used in food production equipment and in other food contact materials on the Danish and the Nordic Market 2013-2014. *Int J Food Contam*. 9 mars 2016;3(1):3.
4. Xie M, Wu Y, Little JC, Marr LC. Phthalates and alternative plasticizers and potential for contact exposure from children's backpacks and toys. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. janv 2016;26(1):119-24.
5. Malarvannan G, Onghena M, Verstraete S, van Puffelen E, Jacobs A, Vanhorebeek I, et al. Phthalate and alternative plasticizers in indwelling medical devices in pediatric intensive care units. *J Hazard Mater*. 5 févr 2019;363:64-72.
6. Poitou K, Rogez-Florent T, Lecoeur M, Danel C, Regnault R, Vérité P, et al. Analysis of Phthalates and Alternative Plasticizers in Gloves by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Liquid Chromatography–UV Detection: A Comparative Study. *Toxics*. sept 2021;9(9):200.
7. Kim DY, Chun SH, Jung Y, Mohamed DFMS, Kim HS, Kang DY, et al. Phthalate Plasticizers in Children's Products and Estimation of Exposure: Importance of Migration Rate. *Int J Environ Res Public Health*. nov 2020;17(22):8582.
8. Fromme H, Schütze A, Lahrz T, Kraft M, Fembacher L, Siewering S, et al. 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*. janv 2016;219(1):33-9.
9. Eckert E, Müller J, Höllerer C, Purbojo A, Cesnjevar R, Göen T, et al. Plasticizer exposure of infants during cardiac surgery. *Toxicol Lett*. 15 sept 2020;330:7-13.

10. Chao KP, Huang CS, Wei CY. Health risk assessments of DEHP released from chemical protective gloves. *J Hazard Mater.* 11 févr 2015;283:53-9.
11. Mariana M, Feiteiro J, Verde I, Cairrao E. The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review. *Environ Int.* 1 sept 2016;94:758-76.
12. Axelsson J, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Lindh CH, Jönsson BAG, Giwercman A. Prenatal phthalate exposure and reproductive function in young men. *Environ Res.* avr 2015;138:264-70.
13. Ferguson KK, Rosen EM, Rosario Z, Feric Z, Calafat AM, McElrath TF, et al. Environmental phthalate exposure and preterm birth in the PROTECT birth cohort. *Environ Int.* 1 nov 2019;132:105099.
14. Yuan XQ, Du YY, Liu C, Guo N, Teng XM, Hua X, et al. Phthalate metabolites and biomarkers of oxidative stress in the follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Sci Total Environ.* 10 oct 2020;738:139834.
15. Capela D, Mhaouty-Kodja S. Effects of pubertal exposure to low doses of di-(2-ethylhexyl)phthalate on reproductive behaviors in male mice. *Chemosphere.* 1 janv 2021;263:128191.
16. Chiang C, Flaws JA. Subchronic Exposure to Di(2-ethylhexyl) Phthalate and Diisononyl Phthalate During Adulthood Has Immediate and Long-Term Reproductive Consequences in Female Mice. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* 1 avr 2019;168(2):620-31.
17. Khasin LG, Della Rosa J, Petersen N, Moeller J, Kriegsfeld LJ, Lishko PV. The Impact of Di-2-Ethylhexyl Phthalate on Sperm Fertility. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:426.
18. Ma T, Zhou Y, Xia Y, Jin H, Wang B, Wu J, et al. Environmentally relevant perinatal exposure to DBP disturbs testicular development and puberty onset in male mice. *Toxicology.* juill 2021;459:152860.
19. Saillenfait AM, Sabaté JP, Robert A, Cossec B, Roudot AC, Denis F, et al. Adverse effects of diisooctyl phthalate on the male rat reproductive development following prenatal exposure. *Reprod Toxicol.* 1 déc 2013;42:192-202.
20. Adir M, Combelles CMH, Mansur A, Ophir L, Hourvitz A, Orvieto R, et al. Dibutyl phthalate impairs steroidogenesis and a subset of LH-dependent genes in cultured human mural granulosa cell in vitro. *Reprod Toxicol Elmsford N.* avr 2017;69:13-8.
21. Mariana M, Cairrao E. Phthalates Implications in the Cardiovascular System. *J Cardiovasc Dev Dis.* 22 juill 2020;7(3):26.
22. Trasande L, Liu B, Bao W. Phthalates and attributable mortality: A population-based longitudinal cohort study and cost analysis. *Environ Pollut.* 1 janv 2022;292:118021.
23. 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.
24. Fernandez-Canal C, Pinta PG, Eljezi T, Larbre V, Kauffmann S, Camilleri L, et al. Patients' exposure to PVC plasticizers from ECMO circuits. *Expert Rev Med Devices.* 4 mai 2018;15(5):377-83.

25. Deng T, Xie X, Duan J, Chen M. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induced an increase in blood pressure via activation of ACE and inhibition of the bradykinin-NO pathway. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. avr 2019;247:927-34.
26. Zhao JF, Hsiao SH, Hsu MH, Pao KC, Kou YR, Shyue SK, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arch Toxicol*. janv 2016;90(1):181-90.
27. Wang J, Liao Y, Fan J, Ye T, Sun X, Dong S. Apigenin inhibits the expression of IL-6, IL-8, and ICAM-1 in DEHP-stimulated human umbilical vein endothelial cells and in vivo. *Inflammation*. août 2012;35(4):1466-76.
28. Liu N, Jiang L, Sun X, Yao X, Zhai X, Liu X, et al. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induced ROS-dependent autophagic cell death in human vascular endothelial cells. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. oct 2017;44:49-56.
29. Xu J, Wang L, Zhang L, Zheng F, Wang F, Leng J, et al. Mono-2-ethylhexyl phthalate drives progression of PINK1-parkin-mediated mitophagy via increasing mitochondrial ROS to exacerbate cytotoxicity. *Redox Biol*. janv 2021;38:101776.
30. Ban JB, Fan XW, Huang Q, Li BF, Chen C, Zhang HC, et al. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces injury in human umbilical vein endothelial cells. *PloS One*. 2014;9(5):e97607.
31. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*. 1 janv 2018;100:1-19.
32. Wu X, Jiang L, Sun X, Yao X, Bai Y, Liu X, et al. Mono(2-ethylhexyl) phthalate induces autophagy-dependent apoptosis through lysosomal-mitochondrial axis in human endothelial cells. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. août 2017;106(Pt A):273-82.
33. Wormuth M, Scheringer M, Vollenweider M, Hungerbühler K. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal Off Publ Soc Risk Anal*. juin 2006;26(3):803-24.
34. 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.
35. Howdeshell KL, Wilson VS, Furr J, Lambright CR, Rider CV, Blystone CR, et al. A Mixture of Five Phthalate Esters Inhibits Fetal Testicular Testosterone Production in the Sprague-Dawley Rat in a Cumulative, Dose-Additive Manner. *Toxicol Sci*. 1 sept 2008;105(1):153-65.
36. Zhou C, Flaws JA. Effects of an Environmentally Relevant Phthalate Mixture on Cultured Mouse Antral Follicles. *Toxicol Sci*. mars 2017;156(1):217-29.
37. Repouskou A, Stamatakis A, Kitraki E. In utero exposure to phthalates and reproductive toxicity in rodents. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 1 sept 2021;35(5):101512.
38. Hannas BR, Howdeshell KL, Furr J, Earl Gray L. In utero phthalate effects in the female rat: A model for MRKH syndrome. *Toxicol Lett*. 16 déc 2013;223(3):315-21.

39. Bocqué M, Voirin C, Lapinte V, Caillol S, Robin JJ. Petro-based and bio-based plasticizers: Chemical structures to plasticizing properties. *J Polym Sci Part Polym Chem*. 2016;54(1):11-33.
40. Deng T, Xie X, Duan J, Chen M. Exposure to diisononyl phthalate induced an increase in blood pressure through activation of the ACE/ AT1R axis and inhibition of NO production. *Toxicol Lett*. juill 2019;309:42-50.
41. Ahmadpour D, Mhaouty-Kodja S, Grange-Messent V. Disruption of the blood-brain barrier and its close environment following adult exposure to low doses of di(2-ethylhexyl)phthalate alone or in an environmental phthalate mixture in male mice. *Chemosphere*. nov 2021;282:131013.
42. ECHA (European Chemicals Agency). ECHA Substance Information on Bis(2-ethylhexyl) phthalate [Internet]. [cité 18 mars 2022]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.003.829>
43. ECHA (European Chemicals Agency). ECHA Substance Information on Bis(2-ethylhexyl) terephthalate [Internet]. [cité 18 mars 2022]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.026.524>
44. ECHA (European Chemicals Agency). ECHA Substance Information on Di-''isononyl'' phthalate [Internet]. [cité 18 mars 2022]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.044.602>
45. Muñoz-Vega M, Massó F, Páez A, Carreón-Torres E, Cabrera-Fuentes HA, Fragoso JM, et al. Characterization of immortalized human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) for the study of HDL functionality. *Lipids Health Dis*. 9 mars 2018;17(1):44.
46. HMEC-1 (CRL-3243TM) [Internet]. ATCC. [cité 16 févr 2022]. Disponible sur: <https://www.atcc.org/products/crl-3243>
47. Posnack NG, Swift LM, Kay MW, Lee NH, Sarvazyan N. Phthalate exposure changes the metabolic profile of cardiac muscle cells. *Environ Health Perspect*. sept 2012;120(9):1243-51.
48. Juárez-Facio AT, Martín de Lagarde V, Monteil C, Vaugeois JM, Corbiere C, Rogez-Florent T. Validation of a Fast and Simple HPLC-UV Method for the Quantification of Adenosine Phosphates in Human Bronchial Epithelial Cells. *Molecules*. janv 2021;26(20):6324.
49. Posnack NG, Idrees R, Ding H, Jaimes R, Stybayeva G, Karabekian Z, et al. Exposure to phthalates affects calcium handling and intercellular connectivity of human stem cell-derived cardiomyocytes. *PloS One*. 2015;10(3):e0121927.
50. Stanic B, Kokai D, Tesic B, Fa S, Samardzija Nenadov D, Pogrmic-Majkic K, et al. Integration of data from the in vitro long-term exposure study on human endothelial cells and the in silico analysis: A case of dibutyl phthalate-induced vascular dysfunction. *Toxicol Lett*. 1 mars 2022;356:64-74.
51. Liu H, Huang H, Xiao X, Zhao Z, Liu C. Effects of Phthalate Esters (PAEs) on Cell Viability and Nrf2 of HepG2 and 3D-QSAR Studies. *Toxics*. juin 2021;9(6):134.
52. Krüger T, Cao Y, Kjærgaard SK, Knudsen LE, Bonefeld-Jørgensen EC. Effects of phthalates on the human corneal endothelial cell line B4G12. *Int J Toxicol*. août 2012;31(4):364-71.

53. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*. 15 déc 2015;574(2):193-203.
54. Eljezi T, Pinta P, Richard D, Pinguet J, Chezal JM, Chagnon MC, et al. In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line. *Chemosphere*. avr 2017;173:452-9.
55. Yang G, Gao X, Jiang L, Sun X, Liu X, Chen M, et al. 6-Gingerol prevents MEHP-induced DNA damage in human umbilical vein endothelia cells. *Hum Exp Toxicol*. nov 2017;36(11):1177-85.
56. Chen YH, Wu YJ, Chen WC, Lee TS, Tsou TC, Chang HC, et al. MEHP interferes with mitochondrial functions and homeostasis in skeletal muscle cells. *Biosci Rep*. 17 avr 2020;40(4):BSR20194404.
57. Faulkner A, Lynam E, Purcell R, Jones C, Lopez C, Board M, et al. Context-dependent regulation of endothelial cell metabolism: differential effects of the PPAR β/δ agonist GW0742 and VEGF-A. *Sci Rep*. 12 mai 2020;10(1):7849.
58. Wang R, Wang M, Ye J, Sun G, Sun X. Mechanism overview and target mining of atherosclerosis: Endothelial cell injury in atherosclerosis is regulated by glycolysis (Review). *Int J Mol Med*. janv 2021;47(1):65-76.
59. Yetkin-Arik B, Vogels IMC, Nowak-Sliwinska P, Weiss A, Houtkooper RH, Van Noorden CJF, et al. The role of glycolysis and mitochondrial respiration in the formation and functioning of endothelial tip cells during angiogenesis. *Sci Rep*. 30 août 2019;9(1):12608.
60. Wagner N, Wagner KD. PPARs and Angiogenesis-Implications in Pathology. *Int J Mol Sci*. 10 août 2020;21(16):E5723.
61. Zhang L, Sun W, Duan X, Duan Y, Sun H. Promoting differentiation and lipid metabolism are the primary effects for DINP exposure on 3T3-L1 preadipocytes. *Environ Pollut*. 1 déc 2019;255:113154.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les gants à usage professionnel constituent une pratique courante en milieu professionnel car ce sont des équipements de protection. Selon une estimation de 2007, l'utilisation des gants concernerait quasiment six millions de personnes aux États-Unis (279). Il faut souligner que cette estimation n'a pris en considération que les gants de protection chimique. Bien qu'il soit difficile d'estimer la population concernée par l'usage des gants à travers le monde, il est indéniable que le port de gants cible une population conséquente puisque leur usage concerne différents secteurs d'activité (hospitalier, agro-alimentaire, recherche scientifique, etc.). Pour autant, la composition des gants demeure à ce jour inconnue puisque les substances utilisées pour sa fabrication ne sont pas données. Plusieurs études ont observé la présence des plastifiants dans les gants à usage professionnel (52,53,82–84). Les plastifiants sont largement employés pour rendre les matériaux plastiques souples et élastiques. Cette famille de composés chimiques est sujette à controverse car les effets de certains plastifiants sont considérés comme étant extrêmement préoccupants pour la santé (252). Toutefois, aucune étude ne s'est réellement positionnée sur l'analyse des plastifiants dans les gants d'après une revue de la littérature.

Pour mener à bien ce projet, une sélection d'échantillons de gants a été faite de sorte à être représentative du marché actuel. Au total, quatre catégories de gants ont été étudiées, à savoir des gants en latex, néoprène, nitrile et vinyle. L'inquiétude vis-à-vis des plastifiants s'explique par le fait qu'ils ne sont pas liés de manière covalente et qu'ils peuvent être relargués. Il en a résulté un contexte de substitution des composés préoccupants par des plastifiants alternatifs. La sélection des plastifiants d'intérêt a été faite en prenant en considération ces aspects. Une analyse des plastifiants extraits des échantillons de gants a ensuite été réalisée par interrogation des bibliothèques de spectres de masse pour adapter au mieux la sélection des analytes étudiés à la matrice d'étude. Au total, treize plastifiants d'intérêt ont été choisis. Parmi cette sélection, il y a onze phtalates (BBP, DBP, DCHP, DEHP, DEP, DIBP, DINP, DMP, DNOP, DphP et DPP) et deux autres plastifiants (DEHT et TOTM).

Pour caractériser les teneurs en plastifiants dans les gants, le premier objectif a été de développer des méthodes analytiques. Ces développements ont concerné l'optimisation des techniques chromatographiques pour l'analyse simultanée des plastifiants en vue de leur quantification. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'ULR 7365 GRITA de l'Université de Lille. Les techniques chromatographiques permettent de séparer plusieurs composés en mélange et c'est pourquoi elles ont été choisies pour ce travail, en l'occurrence il s'agit de la GC-MS et de l'HPLC-DAD. Pour les développements chromatographiques, des colonnes

apolaires ont été utilisées (5% phényle/95% méthyl polysiloxane en GC et C18 en HPLC). Dans la littérature, la séparation chromatographique des plastifiants est majoritairement effectuée avec cette catégorie de colonnes (cf Chapitre 2, § 2. Méthodes d'analyse). Les résultats des optimisations des méthodes chromatographiques ont montré que les deux techniques chromatographiques sont adaptées pour l'analyse des plastifiants en routine. En 35 minutes d'analyse, la séparation de l'ensemble des plastifiants d'intérêt a été obtenue par HPLC-DAD contrairement à la GC-MS pour laquelle une séparation satisfaisante n'a été obtenue que pour onze plastifiants. En effet, des difficultés de séparation en GC-MS ont été rencontrées pour plusieurs plastifiants, à savoir pour le DNOP, le DEHT, le DINP et le DCHP. Dans les conditions chromatographiques optimisées, comme la coélution entre le DNOP, le DEHT et le DINP n'a pas pu être résolue, le mode SIM a été utilisé. Les optimisations des paramètres de masse ont permis de s'affranchir de la coélution entre le DEHT et le DINP par la sélection de rapports m/z de quantification différents, respectivement un m/z de 112,1 et un m/z de 293,1. Le mode SIM présente toutefois des limites, notamment lorsque deux analytes mal résolus présentent des spectres de masse proches, en pratique cela a été constaté entre le DNOP et le DEHT, où aucun rapport m/z spécifique n'a pu être déterminé entre ces deux composés. Alors qu'une séparation satisfaisante de ces deux analytes a été rapportée dans la littérature par l'équipe de Gimeno *et al.* (2014) avec des conditions d'analyse comparables, nos optimisations n'ont pas permis d'atteindre ce résultat (75). En parallèle de ce problème, le profil chromatographique obtenu pour le DCHP n'a pas été considéré comme satisfaisant. Cela diverge avec les résultats issus d'une précédente étude puisque la symétrie du pic pour le DCHP a été obtenue en GC-MS dans des conditions d'analyse similaires (96). C'est pourquoi, le DNOP et le DCHP ont été écartés pour la suite de l'étude en GC-MS. En ce sens, la méthode HPLC-DAD développée constitue une méthode orthogonale à la méthode en GC-MS car elle permet d'analyser ces deux analytes.

Bien que tous les plastifiants aient été inclus à la suite des optimisations en HPLC-DAD, il faut souligner que les développements analytiques se sont aussi heurtés à certaines difficultés. En effet, un pic résiduel de DEHT a été identifié de manière inattendue à la suite de l'injection d'un blanc instrumental dans les conditions chromatographiques optimisées. De plus, une augmentation de l'intensité de ce pic a été constatée au cours du temps. L'origine de cette contamination a été recherchée et a révélé un relargage de DEHT par les tubulures du système chromatographique. Pour éviter ce phénomène, il a été décidé de placer une colonne de piégeage (colonne C18, 100 mm x 2,1 mm *i.d.*, 5 μ m) entre la chambre de mélange des solvants et l'injecteur comme cela a été décrit par Descat *et al.* (2020) (89).

Dans le domaine analytique, en raison de l'omniprésence des plastifiants dans l'environnement, les risques de contamination sont bien connus et les analystes y sont attentifs. Les sources de contamination ne concernent pas uniquement les systèmes chromatographiques comme cela a été évoqué précédemment, les solvants et les consommables en plastique sont aussi des sources potentielles. Différentes sources ont été identifiées dans le cadre de ce travail, il s'agit des distributeurs de solvants et des cônes de micropipettes. C'est pourquoi, le recours aux consommables en plastique a été limité au maximum dans la mesure du possible, en privilégiant les matériaux en verre comme les tubes à hémolyse. Concernant la verrerie réutilisable, des procédures de nettoyage par rinçage à l'aide des solvants organiques ont été appliquées comme cela a été décrit dans la littérature (268). Lors du recours aux consommables en plastique, l'absence de contamination par les plastifiants a été vérifiée avant de les utiliser. En plus de ces précautions prises, des contrôles analytiques ont été mis en œuvre.

À la suite des optimisations des méthodes chromatographiques, le deuxième objectif a été de déterminer la composition en plastifiants dans les gants. Pour cela, les deux méthodes d'analyse ont été validées par l'approche des profils d'exactitude décrite par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (270). Contrairement aux méthodes de validation classiques, cette validation repose sur un critère unique : il s'agit de l'exactitude. Bien que son utilisation ait été démontrée en pratique pour la validation des méthodes destinées à l'analyse des plastifiants en routine tels que pour des applications aux dispositifs médicaux, elle reste assez peu mise en œuvre en général (92). Les résultats de la validation ont montré d'un point de vue général que des seuils de quantifications plus faibles sont obtenus par HPLC-DAD, puisque les limites de quantification obtenues sont comprises respectivement entre 0,02 et 40,14 µg/ml (GC-MS) et entre 0,05 et 0,5 µg/ml (HPLC-DAD).

En vue de l'application de ces méthodes à l'analyse de la composition des gants, la méthode d'extraction des plastifiants a été mise au point. Une technique d'extraction miniaturisée par immersion des échantillons de gants dans un solvant organique a été choisie en se basant sur l'étude de Chao *et al.* (2013) (82). C'est une technique simple et facile à mettre en œuvre car elle nécessite du matériel couramment utilisé en laboratoire. Cette technique présente l'avantage de pouvoir effectuer plusieurs extractions en parallèle. En raison de l'absence d'information concernant la composition en plastifiants dans les gants, des essais expérimentaux ont été réalisés avec différents solvants organiques. Il faut noter qu'il est difficile de choisir un solvant en se basant sur la littérature car les capacités d'extraction des solvants peuvent différer en fonction des plastifiants d'intérêt et de la matrice d'étude. Un

solvant pourra être adapté à l'extraction de certains plastifiants mais pas forcément à l'ensemble des plastifiants (82). Le rendement d'extraction dépend du solvant utilisé, notamment de sa polarité. Ainsi, différents solvants ont été évalués, il s'agit de l'acétone, du cyclohexane et du dichlorométhane. Au cours de ces essais, les paramètres de temps et de volumes d'extraction ont aussi été évalués. Les conditions optimisées pour l'extraction sont les suivantes : l'immersion dans 2 ml d'acétone pendant 30 minutes. En raison de l'absence de matériaux de référence pour les gants, il n'a pas été possible d'évaluer le rendement d'extraction. Les paramètres optimisés ont donc été choisis en fonction du nombre et des quantités de plastifiants extraits, pour avoir des résultats les plus exhaustifs possibles.

Cette technique d'extraction des plastifiants a ensuite été mise en application pour l'analyse de leurs teneurs dans l'échantillonnage de gants sélectionnés (gants en latex, néoprène, nitrile et vinyle). Au total, sept plastifiants ont été identifiés sur l'ensemble des dix échantillons de gants, avec les deux méthodes confondues. Des disparités de teneurs en plastifiants ont été mises en évidence entre les catégories de gants. Comme cela était attendu, les teneurs en plastifiants les plus élevées ont été obtenues dans les échantillons de gants en vinyle (jusqu'à 44%, m/m). En plus des disparités de teneurs en plastifiants mises en évidence entre les catégories de gants, des disparités ont aussi été observées au sein d'une même catégorie de gants.

Concernant la comparaison des résultats obtenus avec les deux méthodes analytiques, l'analyse par GC-MS a permis de quantifier une gamme plus large de concentrations de plastifiants dans les extraits de gants. En effet, les plastifiants minoritaires et majoritaires ont été quantifiés par GC-MS. Au contraire, seuls les plastifiants majoritaires ont pu être quantifiés dans les gants en vinyle en HPLC-DAD. Cette différence s'explique par l'étape de dilution obligatoire des échantillons dans la phase mobile qui est requise afin d'éviter la précipitation des analytes dans le système chromatographique. Cela constitue donc une limite pour la quantification des plastifiants minoritaires. En raison de la dilution en HPLC-DAD, aucun des treize plastifiants n'a été détecté dans les gants en nitrile et en néoprène. Quant aux gants en latex, les plastifiants ont été détectés mais n'ont pas pu être quantifiés. Malgré cela, il est intéressant de souligner que les résultats obtenus pour les plastifiants majoritaires sont en adéquation entre les deux méthodes, car les mêmes plastifiants et des teneurs comparables ont été rapportés. Les résultats obtenus soulignent la complémentarité de ces deux techniques pour l'analyse des plastifiants dans les gants.

Concernant la nature des plastifiants identifiés dans les gants, il a été surprenant de quantifier des plastifiants qui sont actuellement considérés comme étant présumés toxiques pour la reproduction, par exemple le DEHP a été quantifié dans tous les échantillons. L'inclusion de

plastifiants alternatifs s'est révélée pertinente dans ce travail car le DEHT et le DINP ont aussi été retrouvés. Cela montre que l'utilisation des plastifiants de substitution concerne la fabrication des gants à usage professionnel. Néanmoins, la présence de ces plastifiants ne s'accompagne pas nécessairement de l'absence des phtalates réglementés. Par exemple pour les gants en vinyle, le DEHP a été caractérisé de manière concomitante avec le DEHT et/ou le DINP. La législation actuelle semble inappropriée pour les gants au regard de ces résultats.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail ont permis de fournir de nouvelles données concernant les teneurs en plastifiants dans les gants à usage professionnel. Les résultats de cette étude soulignent que le port de gant constitue une source d'exposition aux plastifiants, notamment aux phtalates. Cela a été obtenu grâce au développement de méthodes analytiques orthogonales, qui sont rapides, reproductibles et faciles à implémenter au laboratoire. Cela suscite néanmoins des inquiétudes pour les professionnels concernés au regard des teneurs quantifiées et des compositions qui se caractérisent par des mélanges de plastifiants. Les résultats apportés par cette étude peuvent s'inscrire dans une démarche plus large visant à réduire l'exposition humaine aux plastifiants, car ils peuvent guider le choix des gants en fonction de leurs teneurs en plastifiants. Sachant que les plastifiants peuvent être relargués lors du port de gants, il serait intéressant d'évaluer les conditions de relargage des plastifiants dans les conditions réelles d'utilisation. En effet, le port de gants s'accompagne d'un phénomène d'occlusion. Ce phénomène entraîne une augmentation de l'hydratation de la peau par sudation (171). L'influence de la sueur sur la bioaccessibilité cutanée des plastifiants a été rapportée (85).

Les gants constituent donc une réelle source d'exposition par voie cutanée. Dans le contexte de multi-exposition, les sources et les voies d'expositions sont multiples et peuvent se combiner, ainsi l'exposition par voie cutanée s'ajoute aux autres voies. À la suite de leur absorption, les plastifiants peuvent atteindre la circulation sanguine et se distribuer dans l'organisme. Ainsi, les plastifiants peuvent interagir avec les cellules de l'endothélium, qui sont au contact direct du sang.

Dans ce contexte, le troisième objectif a été d'évaluer la toxicité *in vitro* des plastifiants sur les cellules endothéliales (HMEC-1). Pour ce travail de thèse, le choix s'est porté sur un modèle de cellules endothéliales, en l'occurrence une lignée de cellules endothéliales microvasculaires issues du derme humain (HMEC-1). Il s'agit de cellules qui présentent un phénotype physiologique (280,281). Afin de mimer au mieux les conditions réelles

d'exposition aux plastifiants, une relation effet-temps a été étudiée respectivement avec des expositions cellulaires de manière continue (24, 48 et 72 heures) et répétée (trois heures par jour sur trois jours, soit J1, J2 et J3). La toxicité endothéliale de trois plastifiants majoritairement quantifiés dans les gants a été évaluée, il s'agit du DEHP, du DEHT et du DINP. Il est intéressant de noter que la sélection de ces trois plastifiants tient compte du contexte de substitution qui a lieu actuellement, par le remplacement des phtalates classés comme étant présumés toxiques. C'est par exemple le cas du DEHP par des plastifiants « dits alternatifs » qui ne sont actuellement pas définis comme des substances CMR, dans ce cas le DEHT et le DINP. Les expositions ont été réalisées avec les molécules seules et avec le mélange des trois, afin de tenir compte de l'exposition à plusieurs plastifiants dans le contexte de multi-exposition. La question des effets mélanges se pose car les substances peuvent s'avérer plus toxiques lorsqu'elles sont combinées. Pourtant, les données concernant les effets mélanges des plastifiants sur le système vasculaire restent à ce jour limitées, ce qui confère à ce travail sa singularité (282). Dans la littérature, les expositions des cellules endothéliales vasculaires aux plastifiants ont généralement été réalisées avec des concentrations de l'ordre du micromolaire, comprises entre 5 et 200 μM (245–247,283). Dans le cadre de cette thèse, une concentration d'étude de 15 mg/l (soit environ 40 μM) a été choisie.

D'une manière générale, cette étude a permis de mettre en évidence des effets différents en fonction des composés, sur les cellules endothéliales. Alors que le DEHP, le DINP impactent significativement la viabilité cellulaire, le DEHT fait figure d'exception car aucune modification notable n'a été observée pour celui-ci. Cette absence d'effet du DEHT est en accord avec les résultats de viabilité cellulaire obtenus sur un autre modèle cellulaire, une lignée de fibroblastes, et ce avec des concentrations étudiées plus élevées (de 0,01 à 0,1 mg/ml) (284). Il est intéressant de noter que le nombre d'expositions (expositions répétées) n'a pas d'influence sur la viabilité cellulaire, contrairement à ce qui était *a priori* supposé, car les effets sont comparables. Le mode d'exposition pourrait expliquer ces résultats car les cellules sont exposées de manière intermittente (3h/j) suivi d'un remplacement du milieu. Cela pourrait contribuer à améliorer la capacité de récupération des cellules et donc ne pas causer d'effets délétères majeurs sur leurs fonctions. En s'intéressant désormais à la nature des effets, une augmentation a été observée : soit de manière transitoire pendant les expositions continues (à 24 heures) avant une diminution temps-dépendante, soit de manière réitérée au cours des expositions répétées (à J1, J2 et J3). Cela est étonnant au regard des données de la littérature car la diminution de la viabilité liée aux plastifiants a été rapportée sur les cellules endothéliales

(245–247). Il faut noter que la durée d'exposition la plus courte étudiée correspond à 24 heures dans le cadre de ces études, ainsi les résultats obtenus pour les expositions répétées apportent de nouvelles données. Sur un autre type cellulaire (hépatocarcinome), une tendance à l'augmentation de la viabilité cellulaire a été décrite dès 24 heures pour le DEHP et le DINP, chacun ayant été testé individuellement (285). Dans cette même étude, la relation effet-temps observée pour ces composés, avec une diminution plus marquée à 72 heures par rapport à 48 heures, est en accord avec les effets obtenus au niveau endothélial. La diminution de la viabilité à 72 heures d'exposition est en adéquation avec les résultats de comptage cellulaire, la diminution de la viabilité s'accompagne d'une réduction de la prolifération cellulaire. Ces résultats sont en accord avec une étude ayant rapportée une diminution de la prolifération cellulaire sur des cellules endothéliales de cornée humaine exposées au DEHP (100 μ M) (286). Mais cela ne permet pas d'expliquer l'augmentation transitoire de la prolifération à 24 heures, puisqu'à ce temps, aucun effet n'a été observé pour les résultats du comptage. Bien que le test du MTT soit couramment utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire, il faut noter que les résultats peuvent aussi refléter une réduction du MTT par une reprogrammation métabolique et mitochondriale en réponse à un stress (287). Cette hypothèse semble plausible et pourrait résulter d'un stress induit par les plastifiants.

L'exposition aux plastifiants peut entraîner des modifications biochimiques à l'échelle cellulaire. Il a été montré expérimentalement que les plastifiants peuvent induire un stress oxydant, cela a été mis en évidence pour plusieurs toxicités d'organes dont la toxicité cardiovasculaire impliquant les cellules endothéliales (246,247,283). Afin d'étudier les perturbations cellulaires induites par l'exposition aux plastifiants sur les HMEC-1, il a été décidé d'évaluer le statut redox cellulaire en considérant le glutathion intracellulaire total. Indépendamment des conditions et du nombre d'expositions, les expositions répétées des HMEC-1 aux plastifiants n'ont pas montré d'effet. Au contraire, une augmentation du glutathion intracellulaire total a été observé à partir de 48 heures de manière transitoire pour le DEHP et le DINP tandis que cela a eu lieu de manière prolongée pour le mélange des plastifiants mais pas pour le DEHT. Il est possible que les modifications observées résultent d'un excès d'espèces réactives induites par ces composés. Cela a été décrit précédemment pour les cellules endothéliales exposées au MEHP, la production de ROS a été corrélée à la déplétion de glutathion (forme réduite) (246,283). À cet égard, il serait intéressant de déterminer le ratio GSH/GSSG pour comprendre quelle espèce participe à l'augmentation observée. Afin de comprendre si les modifications de la cytoprotection médiée par le glutathion sont

accompagnées d'un dysfonctionnement cellulaire, l'état énergétique cellulaire a été étudié en analysant les adénosines phosphates intracellulaires (ATP, ADP et AMP). Il faut noter que dans les échantillons, seules l'ATP et l'ADP ont été quantifiées par HPLC-DAD, l'AMP n'a pas été détectée. La modification de l'état énergétique cellulaire en faveur d'une diminution du ratio ATP/ADP est survenue de manière différée à 72 heures d'exposition, par rapport au déséquilibre de l'état redox. L'effet du mélange semble corrélé à l'effet du DEHP. En revanche, le DINP et le DEHT n'ont montré aucune modification sur ce paramètre. La diminution du ratio ATP/ADP peut refléter une consommation en ATP qui n'est pas ou peu compensée. Cependant, au regard des résultats de viabilité et du statut redox, il est étonnant de ne pas observer ce déséquilibre énergétique plus précocement. D'autant que les résultats issus de l'étude de la respiration mitochondriale ont montré qu'elle est une cible de l'action des plastifiants dès 24 heures pour le DEHP ou dès 48 heures pour le DINP et le mélange. La production d'ATP mitochondriale couplée à la respiration représente en condition physiologique près de 70% de la production d'ATP des HMEC-1. L'exposition aux plastifiants entraîne une diminution de la consommation d'oxygène et de la production d'ATP mitochondriales, en notant que l'effet du mélange est comparable à celui du DEHP tandis que le DINP ne semble pas accentuer l'effet du mélange. Ces résultats mettent en évidence une altération de la fonction mitochondriale face au stress induit par les plastifiants. Cependant, elle ne reflète pas l'état énergétique cellulaire puisque ces résultats ne sont pas superposables. Le maintien des fonctions cellulaires pourrait laisser penser à un mécanisme d'adaptation cellulaire passant par les voies métaboliques. Cela corrobore avec la caractérisation de l'action rapide du DEHP car un effet sur la fonction mitochondriale a été observé à la suite d'une courte durée d'exposition (de trois heures), associée à une augmentation de l'acidification extracellulaire, reflet d'une production de lactates. Bien qu'une dégradation du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale ait été rapportée pour le MEHP sur les cellules du muscle squelettique, cette hypothèse semble peu probable au regard de l'action rapide du DEHP sur la fonction mitochondriale (288). L'hypothèse d'une adaptation des voies métaboliques des cellules endothéliales exposées aux plastifiants semble d'autant plus plausible que l'acidification cellulaire observée expérimentalement laisse supposer l'implication de la glycolyse anaérobie au détriment de la respiration mitochondriale. Il est intéressant de souligner que l'adaptation du métabolisme des cellules endothéliales a déjà été décrite pour les pathologies vasculaires (athérosclérose et angiogenèse) et qu'elle résulterait de facteurs endogènes (LDL oxydées et facteurs angiogéniques) (249,250). Par analogie, les xénobiotiques pourraient impacter le métabolisme des cellules endothéliales, comme par exemple les plastifiants circulants. Dans la littérature, il

Il y a des divergences concernant le mécanisme sous-jacent à l'adaptabilité métabolique des cellules endothéliales concernant les pathologies vasculaires. Pour l'angiogenèse, l'augmentation de l'oxydation des acides gras et l'augmentation de la glycolyse impliqueraient la voie de signalisation PPAR (289). Il est intéressant de noter que cette voie a aussi été suggérée concernant l'adaptation métabolique de cardiomyocytes exposés au DEHP (236). Pour l'athérosclérose, l'augmentation de la glycolyse observée au niveau endothélial impliquerait plutôt le stress oxydant (250). Il serait intéressant de confronter expérimentalement ces deux hypothèses mécanistiques. En effet, elles semblent pertinentes pour le cas des plastifiants car ils sont connus comme étant des ligands de PPAR. Par exemple, les effets du DEHP sur les cardiomyocytes seraient liés à l'activation de PPAR- α , et les effets du DINP sur les adipocytes seraient quant à eux médiés par une activation de PPAR- γ (236,290). Par ailleurs, la toxicité des plastifiants pourrait aussi résulter d'un stress oxydant comme cela a été rapporté pour la cytotoxicité du MEHP sur les cellules endothéliales (HUVEC) (246).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis d'apporter de nouvelles informations au sujet des plastifiants dans les gants à usage professionnel. Bien qu'ils soient largement utilisés au quotidien dans la sphère professionnelle, la composition des gants reste à ce jour peu documentée. Cela concerne notamment les plastifiants dont certains usages sont débattus. Les développements analytiques (séparation et extraction) ont été menés pour pallier ce manque d'information. Deux méthodes analytiques (GC-MS et HPLC-DAD) ont été développées pour l'analyse simultanée de treize plastifiants. Elles sont applicables en routine car la durée d'une analyse est de 35 minutes. Ces deux méthodes sont complémentaires en termes de seuils de quantification, de nombre de plastifiants analysés et de leur mise en œuvre. Les méthodes ont été validées en vue de leur application pour l'analyse des plastifiants dans les gants. Dans ce but, une technique extractive par immersion dans l'acétone a été mise au point. L'extraction des plastifiants met en jeu de faibles volumes de solvants et une faible masse de gants. L'acétone a été choisi comme solvant d'extraction car il présente les meilleures capacités extractives pour répondre à l'objectif visé. En résumé, les développements analytiques ont permis de développer des méthodes faciles à mettre en œuvre, reproductibles et applicables en routine. Les méthodes extractives et séparatives se sont révélées être adaptées pour une application aux gants puisque l'analyse des extraits a permis d'identifier sept plastifiants au total. Malgré que l'HPLC-DAD se soit révélée plus sensible et plus résolutive, la GC-MS a montré être plus appropriée pour quantifier à la fois les plastifiants minoritaires et majoritaires. Les teneurs massiques en plastifiants sont très variables au sein de l'échantillonnage, comprises entre 0,0005 jusqu'à 44% (tous plastifiants confondus). Parmi les composés majoritaires, il y a le DEHP (CMR 1B) et deux plastifiants de substitution du DEHP, respectivement le DEHT (non classé et non réglementé) et le DINP (non classé et réglementé). Ces résultats ont permis de mettre en évidence que les gants constituent une source d'exposition par voie cutanée, et ce pour plusieurs plastifiants. Cela soulève des interrogations concernant l'exposition humaine à ces substances et à de possibles effets mélange. Afin de compléter ces résultats, il serait intéressant d'évaluer la bioaccessibilité cutanée afin de mimer les conditions réelles d'exposition. En effet, les teneurs en plastifiants sont des données nécessaires mais ne sont pas suffisantes pour déterminer la dose d'exposition. De plus, l'évaluation du passage transcutané *ex vivo* permettrait de fournir des informations supplémentaires car elles sont actuellement manquantes concernant les gants. L'apport de ces données pourrait à long terme aider à faire évoluer le cadre réglementaire. Par ailleurs, les méthodes analytiques développées pourraient être adaptées pour l'analyse d'autres matrices d'étude.

La question a ensuite été de savoir si les plastifiants majoritaires pouvaient causer des dommages au niveau endothélial. Les résultats obtenus à partir des gants laissent penser à une possible absorption par voie cutanée des plastifiants. Dans le contexte de multi-exposition, cela peut s'ajouter aux autres voies d'exposition. Bien que la circulation sanguine contribue aux effets des plastifiants au sein de l'organisme, très peu d'études se sont intéressées aux effets à ce niveau. Pourtant, les cellules endothéliales sont directement exposées aux plastifiants circulants. Cette étude fournit de nouveaux éléments concernant les effets des plastifiants, et notamment de l'effet mélange qui n'est pas assez pris en considération au niveau endothélial. La non-cytotoxicité du DEHT a été mise en évidence, et fournit des éléments en faveur de son statut de plastifiant de substitution. Au contraire, la cytotoxicité endothéliale du DINP a été montrée, tout comme celle du DEHP et du mélange. L'exposition des cellules aux plastifiants a entraîné un stress cellulaire, ciblant le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Cependant, les répercussions sur le fonctionnement cellulaire en termes de statut redox et de viabilité ont été observées de manière plus tardive par rapport aux effets mitochondriaux. Un schéma récapitulatif est représenté en figure 52, pour résumer l'ensemble des effets biologiques obtenus dans le cadre de cette thèse, à la suite des expositions continues des HMEC-1 aux plastifiants (DEHP, DINP et mélange dit MIX).

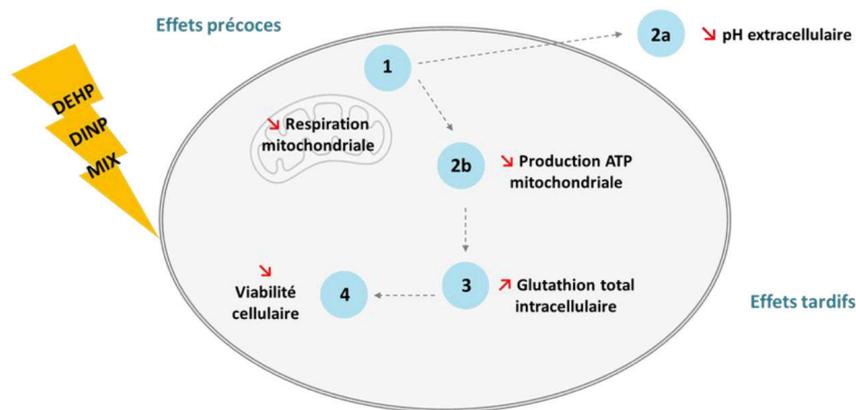


Figure 52 : Schéma récapitulatif des effets des plastifiants (DEHP, DINP et MIX) observés sur les cellules endothéliales HMEC-1, à la suite des expositions continues

À la suite des expositions cellulaires (HMEC-1), une altération de la respiration mitochondriale a été observée et elle s'accompagne d'une diminution de la production d'ATP mitochondriale et d'une diminution du pH extracellulaire. Il est intéressant de noter que l'effet du DEHP a été observé de manière plus précoce par rapport à l'effet du DINP et du MIX. Pour autant, la diminution de l'ATP intracellulaire a été observée de manière plus tardive pour le DEHP et le MIX (sans effet pour le DINP) par rapport aux effets mitochondriaux. Un mécanisme d'adaptation semble plausible, d'autant que la modification du statut redox intracellulaire ne surviendrait que plus tardivement par rapport aux effets mitochondriaux observés, et s'accompagne *in fine* d'une diminution marquée de la viabilité cellulaire.

Un phénomène d'adaptation du métabolisme des cellules endothéliales serait envisageable au regard des résultats. Le mécanisme exact n'est pas connu. Il pourrait impliquer les récepteurs nucléaires (PPAR) et/ou le stress oxydant car ce sont des mécanismes qui ont déjà été décrits dans la toxicité médiée par les plastifiants. Cela est d'autant plus probable que ces mêmes mécanismes semblent aussi cibler les cellules endothéliales en réponse à des facteurs endogènes durant le développement de pathologies cardiovasculaires.

Pour conclure, les résultats issus de ce travail de thèse apportent de nouvelles informations concernant les plastifiants, autant en ce qui concerne la composition des gants que leurs effets au niveau endothélial. Les résultats obtenus soulignent l'intérêt de poursuivre les recherches sur les plastifiants afin de mieux caractériser l'exposition liée au port de gants et des répercussions possibles au niveau endothélial. Les protocoles expérimentaux devront s'attacher à étudier les effets mélange pour refléter au mieux les conditions réelles d'exposition.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv.* 19 juill 2017;3(7):e1700782.
2. PlasticsEurope. *Plastics - The Facts 2020, An analysis of European plastics production, demand and waste data* [Internet]. 2021 [cité 19 août 2021]. Disponible sur: <https://www.plasticseurope.org>
3. Naudin CA. *Nomenclature, classification et formules chimiques des polymères.* Techniques de l'Ingénieur; 1995.
4. Meeker JD, Sathyanarayana S, Swan SH. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 27 juill 2009;364(1526):2097-113.
5. Poitou K. *Etude des plastifiants présents dans les gants à usage professionnel et mise en place d'un modèle d'étude de toxicité endothéliale* [Thèse d'exercice]. [France]: Université Paris Descartes. Faculté de pharmacie de Paris; 2018.
6. Guillemot M, Patrascu C. *Plastiques, risque et analyse thermique : Les additifs - version 2* [Internet]. INRS; 2019. Disponible sur: www.inrs.fr
7. Hahladakis JN, Velis CA, Weber R, Iacovidou E, Purnell P. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *J Hazard Mater.* 15 févr 2018;344:179-99.
8. Hansen E, Nilsson N, Slot Ravnholt Vium K. *Hazardous substances in plastics - Survey of chemical substances in consumer products No. 132.* The Danish Environmental Protection Agency; 2014.
9. Vieira MGA, da Silva MA, dos Santos LO, Beppu MM. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *Eur Polym J.* 1 mars 2011;47(3):254-63.
10. Krauskopf L, Godwin A. Chapter 5 : Plasticizers. In: *PVC Handbook.* Munich: Hanser Publishers; 2005.
11. Verrier P. *Plastifiants* [Internet]. Techniques de l'Ingénieur; 1992 [cité 20 août 2021]. Disponible sur: www.techniques-ingenieur.fr
12. Bocqué M, Voirin C, Lapinte V, Caillol S, Robin JJ. Petro-based and bio-based plasticizers: Chemical structures to plasticizing properties. *J Polym Sci Part Polym Chem.* 2016;54(1):11-33.
13. Janin C. *Matières premières du caoutchouc* [Internet]. Techniques de l'Ingénieur; 2016 [cité 20 août 2021]. Disponible sur: www.techniques-ingenieur.fr

14. Plasticisers [Internet]. Plasticisers - Information Center. [cité 20 août 2021]. Disponible sur: <https://www.plasticisers.org/plasticisers/>
15. IHS Markit. Plasticizers - Chemical Economics Handbook [Internet]. IHS Markit. 2021 [cité 20 août 2021]. Disponible sur: <https://ihsmarkit.com/products/plasticizers-chemical-economics-handbook.html>
16. Baron J. Polymères [Internet]. [cité 20 août 2021]. Disponible sur: <https://tice.ac-montpellier.fr/ABCDORGA/Famille/Polymere.htm>
17. Godwin Allen D. Plasticizers. In: Craver CD, Carraher CE, éditeurs. Applied Polymer Science: 21st Century. Oxford: Pergamon; 2000. p. 157-75.
18. Immergut EH, Mark HF. Principles of plasticization. In: Platzer NAJ, éditeur. Plasticization and Plasticizer Processes. Washington, D.C.: American Chemical Society; 1965. (Advances in Chemistry; vol. 48).
19. Plasticisers : Ortho-phthalates [Internet]. Plasticisers - Information Center. [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://www.plasticisers.org/plasticiser/ortho-phthalates/>
20. Fahri R, Morel C, Chéron J. Matières plastiques et adjuvants [Internet]. INRS; 2006 [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%20638>
21. Grass M. Dialkyl terephthalates and their use [Internet]. US7964658B2, 2011 [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US7964658B2/en>
22. Plasticisers : Terephthalates [Internet]. Plasticisers - Information Center. [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://www.plasticisers.org/plasticiser/terephthalates/>
23. Plasticisers : Benzoates / Dibenzoates [Internet]. Plasticisers - Information Center. [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://www.plasticisers.org/plasticiser/benzoates-dibenzoates/>
24. Plasticisers : Trimellitates [Internet]. Plasticisers - Information Center. [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://www.plasticisers.org/plasticiser/trimellitates/>
25. Centers for Disease Control and Prevention. Di(isononyl) cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) - General information [Internet]. CDC. 2017 [cité 21 août 2021]. Disponible sur: https://www.cdc.gov/biomonitoring/DINCH_BiomonitoringSummary.html
26. Colle KS, Stanat JER, Reinoso JJ, Godwin AD. C7-C12 Secondary Alcohol Esters of Cyclohexanoic Acid [Internet]. US20100305250A1, 2010 [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US20100305250A1/en>
27. Plasticisers : Adipates [Internet]. Plasticisers - Information Center. [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://www.plasticisers.org/plasticiser/adipates/>
28. Rahman M, Brazel CS. The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. Prog Polym Sci. 1 déc 2004;29(12):1223-48.

29. Thompson CM. Chapter 13 - Plasticizers Industry. In: Industrial Process Profiles for Environmental Use. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, D.C.; 1977.
30. Plasticisers : Azelates [Internet]. Plasticisers - Information Center. [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://www.plasticisers.org/plasticiser/sebacates-2/>
31. Waskitoaji W, Triwulandari E, Haryono A. Synthesis of Plasticizers Derived from Palm Oil and Their Application in Polyvinyl Chloride. *Procedia Chem.* 1 janv 2012;4:313-21.
32. Chen J, Liu Z, Nie X, Jiang J. Synthesis and application of a novel environmental C26 diglycidyl ester plasticizer based on castor oil for poly(vinyl chloride). *J Mater Sci.* 1 juin 2018;53(12):8909-20.
33. ECHA (European Chemicals Agency). Dimethyl phthalate - ECHA Registration Dossier [Internet]. ECHA. [cité 23 août 2021]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu>
34. ECHA (European Chemicals Agency). Bis(2-ethylhexyl) phthalate - ECHA Registration Dossier [Internet]. ECHA. [cité 23 août 2021]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu>
35. Cadogan DF, Howick CJ. Plasticizers. In: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, éditeur. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [Internet]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2000 [cité 21 août 2021]. p. a20_439. Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a20_439
36. Babich MA, Bevington C, Dreyfus MA. Plasticizer migration from children's toys, child care articles, art materials, and school supplies. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1 mars 2020;111:104574.
37. Kim DY, Chun SH, Jung Y, Mohamed DFMS, Kim HS, Kang DY, et al. Phthalate Plasticizers in Children's Products and Estimation of Exposure: Importance of Migration Rate. *Int J Environ Res Public Health.* nov 2020;17(22):8582.
38. Fromme H, Schütze A, Lahrz T, Kraft M, Fembacher L, Siewering S, et al. 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.* janv 2016;219(1):33-9.
39. Fernandez-Canal C, Pinta PG, Eljezi T, Larbre V, Kauffmann S, Camilleri L, et al. Patients' exposure to PVC plasticizers from ECMO circuits. *Expert Rev Med Devices.* 4 mai 2018;15(5):377-83.
40. Eckert E, Müller J, Höllerer C, Purbojo A, Cesnjevar R, Göen T, et al. Plasticizer exposure of infants during cardiac surgery. *Toxicol Lett.* 15 sept 2020;330:7-13.
41. Koniecki D, Wang R, Moody RP, Zhu J. Phthalates in cosmetic and personal care

- products: concentrations and possible dermal exposure. *Environ Res.* avr 2011;111(3):329-36.
42. Ishii S, Katagiri R, Minobe Y, Kuribara I, Wada T, Wada M, et al. Investigation of the amount of transdermal exposure of newborn babies to phthalates in paper diapers and certification of the safety of paper diapers. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1 oct 2015;73(1):85-92.
43. Wormuth M, Scheringer M, Vollenweider M, Hungerbühler K. What Are the Sources of Exposure to Eight Frequently Used Phthalic Acid Esters in Europeans? *Risk Anal.* juin 2006;26(3):803-24.
44. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. INCA 3 : Evolution des habitudes et modes de consommation, de nouveaux enjeux en matière de sécurité sanitaire et de nutrition | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [Internet]. 2017 [cité 24 août 2021]. Disponible sur: <https://www.anses.fr>
45. Schecter A, Lorber M, Guo Y, Wu Q, Yun SH, Kannan K, et al. Phthalate Concentrations and Dietary Exposure from Food Purchased in New York State. *Environ Health Perspect.* avr 2013;121(4):473-9.
46. Fierens T, Servaes K, Van Holderbeke M, Geerts L, De Henauw S, Sioen I, et al. Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* juill 2012;50(7):2575-83.
47. Kiralan M, Toptanci İ, Yavuz M, Ramadan MF. Phthalates levels in cold-pressed oils marketed in Turkey. *Environ Sci Pollut Res.* 1 févr 2020;27(5):5630-5.
48. Pereira J, Selbourne M do C, Poças F. Determination of phthalates in olive oil from European market. *Food Control.* 1 avr 2019;98:54-60.
49. Giuliani A, Zuccarini M, Cichelli A, Khan H, Reale M. Critical Review on the Presence of Phthalates in Food and Evidence of Their Biological Impact. *Int J Environ Res Public Health.* janv 2020;17(16):5655.
50. Tsai MY, Ho CH, Chang HY, Yang WC, Lin CF, Lin CT, et al. Analysis of Pollution of Phthalates in Pork and Chicken in Taiwan Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry and Assessment of Health Risk. *Molecules.* 23 oct 2019;24(21):3817.
51. EFSA (European Food Safety Authority). Bisphénol A [Internet]. EFSA. [cité 11 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/bisphenol>
52. Petersen JH, Jensen LK. Phthalates in soft PVC products used in food production equipment and in other food contact materials on the Danish and the Nordic Market 2013-2014. *Int J Food Contam.* 9 mars 2016;3(1):3.
53. Tsumura Y, Ishimitsu S, Saito I, Sakai H, Tsuchida Y, Tonogai Y. Estimated daily

intake of plasticizers in 1-week duplicate diet samples following regulation of DEHP-containing PVC gloves in Japan. *Food Addit Contam.* avr 2003;20(4):317-24.

54. He M, Zhu L, Yang N, Li H, Yang Q. Recent advances of oral film as platform for drug delivery. *Int J Pharm.* 15 juill 2021;604:120759.

55. Thakur VK, Thakur MK. *Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies, Structure and Chemistry.* John Wiley & Sons; 2015. 552 p.

56. Khatri P, Desai D, Shelke N, Minko T. Role of plasticizer in membrane coated extended release oral drug delivery system. *J Drug Deliv Sci Technol.* 1 avr 2018;44:231-43.

57. 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. *Chromatographia.* 1 août 2008;68(3):227-34.

58. Xie M, Wu Y, Little JC, Marr LC. Phthalates and alternative plasticizers and potential for contact exposure from children's backpacks and toys. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* janv 2016;26(1):119-24.

59. Rudel RA, Camann DE, Spengler JD, Korn LR, Brody JG. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ Sci Technol.* 15 oct 2003;37(20):4543-53.

60. Teil MJ, Moreau-Guigon E, Blanchard M, Alliot F, Gasperi J, Cladière M, et al. Endocrine disrupting compounds in gaseous and particulate outdoor air phases according to environmental factors. *Chemosphere.* 1 mars 2016;146:94-104.

61. Xia M, Ouyang X, Wang X, Shen X, Zhan Y. Occupational exposure assessment of phthalate esters in indoor and outdoor microenvironments. *J Environ Sci.* 1 oct 2018;72:75-88.

62. Qualité de l'air intérieur [Internet]. Ministère de la Transition écologique. 2020 [cité 25 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.ecologie.gouv.fr/qualite-lair-interieur>

63. Fromme H, Lahrz T, Kraft M, Fembacher L, Dietrich S, Sievering S, et al. Phthalates in German daycare centers: Occurrence in air and dust and the excretion of their metabolites by children (LUPE 3). *Environ Int.* 1 nov 2013;61:64-72.

64. Subedi B, Sullivan KD, Dhungana B. Phthalate and non-phthalate plasticizers in indoor dust from childcare facilities, salons, and homes across the USA. *Environ Pollut.* 1 nov 2017;230:701-8.

65. Larsson K, Lindh CH, Jönsson BA, Giovanoulis G, Bibi M, Bottai M, et al. Phthalates, non-phthalate plasticizers and bisphenols in Swedish preschool dust in relation to children's exposure. *Environ Int.* 1 mai 2017;102:114-24.

66. Wang X, Okoffo ED, Banks AP, Li Y, Thomas KV, Rauert C, et al. Phthalate esters in

- face masks and associated inhalation exposure risk. *J Hazard Mater.* 5 févr 2022;423:127001.
67. Viñas P, Campillo N, Pastor-Belda M, Oller A, Hernández-Córdoba M. Determination of phthalate esters in cleaning and personal care products by dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 9 janv 2015;1376:18-25.
68. 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.
69. Marie C, Hamlaoui S, Bernard L, Bourdeaux D, Sautou V, Lémery D, et al. Exposure of hospitalised pregnant women to plasticizers contained in medical devices. *BMC Womens Health.* 20 juin 2017;17(1):45.
70. Van Vliet EDS, Reitano EM, Chhabra JS, Bergen GP, Whyatt RM. A review of alternatives to di (2-ethylhexyl) phthalate-containing medical devices in the neonatal intensive care unit. *J Perinatol.* août 2011;31(8):551-60.
71. Malarvannan G, Onghena M, Verstraete S, van Puffelen E, Jacobs A, Vanhorebeek I, et al. Phthalate and alternative plasticizers in indwelling medical devices in pediatric intensive care units. *J Hazard Mater.* 5 févr 2019;363:64-72.
72. Thelliez A, Descat A, Bouchot P, Kouach M, Goossens JF, Decaudin B, et al. High-performance liquid chromatography–ultraviolet detection method to evaluate the migration of di(2-ethylhexyl) terephthalate and its metabolite from polyvinyl chloride bag in four labile blood products. *Sep Sci Plus.* 2022;5(3-4):65-74.
73. Thelliez A, Décaudin B, Lecoœur M. Impact of the pathogen inactivation process on the migration of di(2-ethylhexyl) phthalate from plasma bags. *Vox Sang* [Internet]. 2022 [cité 10 mai 2022];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vox.13233>
74. HAS (Haute Autorité de Santé). Transfusions de globules rouges homologues : produits, indications, alternatives - Recommandation de bonne pratique. 2014.
75. Gimeno P, Thomas S, Bousquet C, Maggio AF, 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.* 15 févr 2014;949-950:99-108.
76. Bernard L, Cueff R, Breyse C, Décaudin B, Sautou V. Migrability of PVC plasticizers from medical devices into a simulant of infused solutions. *Int J Pharm.* 15 mai 2015;485(1):341-7.
77. Singh G, Gollapalli R, Blinder A, Gallo F, Patel M. A case study demonstrating the migration of diethyl phthalate from an ancillary component to the drug product. *J Pharm*

Biomed Anal. 5 févr 2019;164:574-80.

78. Parlett LE, Calafat AM, Swan SH. Women's exposure to phthalates in relation to use of personal care products. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* mars 2013;23(2):197-206.

79. Guo Y, Kannan K. A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. *Environ Sci Technol.* 17 déc 2013;47(24):14442-9.

80. Tang Z, Chai M, Cheng J, Wang Y, Huang Q. Occurrence and Distribution of Phthalates in Sanitary Napkins from Six Countries: Implications for Women's Health. *Environ Sci Technol.* 3 déc 2019;53(23):13919-28.

81. Gao CJ, Wang F, Shen HM, Kannan K, Guo Y. Feminine Hygiene Products—A Neglected Source of Phthalate Exposure in Women. *Environ Sci Technol.* 21 janv 2020;54(2):930-7.

82. Chao KP, Huang CS, Wei CY. Extraction and percolation of PAEs from chemical protective gloves. *Polym Test.* 1 déc 2013;32(8):1551-7.

83. Chao KP, Huang CS, Wei CY. Health risk assessments of DEHP released from chemical protective gloves. *J Hazard Mater.* 11 févr 2015;283:53-9.

84. Tsumura Y, Ishimitsu S, Kaihara A, Yoshii K, Nakamura Y, Tonogai Y. Di(2-ethylhexyl) phthalate contamination of retail packed lunches caused by PVC gloves used in the preparation of foods. *Food Addit Contam.* juin 2001;18(6):569-79.

85. Zeng D, Kang Y, Chen J, Li A, Chen W, Li Z, et al. Dermal bioaccessibility of plasticizers in indoor dust and clothing. *Sci Total Environ.* 1 juill 2019;672:798-805.

86. Soares S, Barroso M, Gallardo E. A review of current bioanalytical approaches in sample pretreatment techniques for the determination of antidepressants in biological specimens. *Rev Anal Chem.* 1 janv 2021;40(1):12-32.

87. Gimeno P, Maggio AF, Bousquet C, Quoirez A, Civade C, Bonnet PA. Analytical method for the identification and assay of 12 phthalates in cosmetic products: Application of the ISO 12787 international standard "Cosmetics—Analytical methods—Validation criteria for analytical results using chromatographic techniques". *J Chromatogr A.* 31 août 2012;1253:144-53.

88. Zaater MF, Tahboub YR, Al Sayyed AN. Determination of Phthalates in Jordanian Bottled Water using GC–MS and HPLC–UV: Environmental Study. *J Chromatogr Sci.* 1 mai 2014;52(5):447-52.

89. Descat A, Lecoer M, Kouach M, Goossens L, Thelliez A, Odou P, et al. Simultaneous determination of di(2-ethylhexyl) phthalate and diisononylcyclohexane-1,2-dicarboxylate and

their monoester metabolites in four labile blood products by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 20 mars 2020;181:113063.

90. Paíga P, Domingues VF, Wanderley KA, Júnior SA, Delerue-Matos CM. QuEChERS: a sample preparation for extraction of carbaryl from rat feces. *Toxicol Environ Chem.* 3 juill 2015;97(6):687-99.

91. Rodríguez-Ramos R, Socas-Rodríguez B, Santana-Mayor Á, Rodríguez-Delgado MÁ. A simple, fast and easy methodology for the monitoring of plastic migrants in alcoholic and non-alcoholic beverages using the QuEChERS method prior to gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 1 mars 2020;412(7):1551-61.

92. 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.* 15 août 2014;965:158-63.

93. Bernard L, Cueff R, Bourdeaux D, Breysse 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.* févr 2015;407(6):1651-9.

94. Weggler BA, Gruber B, Teehan P, Jaramillo R, Dorman FL. Chapter 5 - Inlets and sampling. In: Snow NH, éditeur. *Separation Science and Technology* [Internet]. Academic Press; 2020 [cité 5 avr 2022]. p. 141-203. (Basic Multidimensional Gas Chromatography; vol. 12). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128137451000052>

95. Net S, Sempéré R, Delmont A, Paluselli A, Ouddane B. Occurrence, Fate, Behavior and Ecotoxicological State of Phthalates in Different Environmental Matrices. *Environ Sci Technol.* 7 avr 2015;49(7):4019-35.

96. Shen HY, Jiang HL, Mao HL, Pan G, Zhou L, Cao YF. Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods. *J Sep Sci.* janv 2007;30(1):48-54.

97. He P xia, Ling Y, Yong W, Yao M yi, Zhang Y jia, Feng X song, et al. Determination of 22 alternative plasticizers in wrap film by solid phase extraction and ultra-high performance supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 26 avr 2022;1669:462916.

98. Paluselli A, Aminot Y, Galgani F, Net S, Sempéré R. Occurrence of phthalate acid esters (PAEs) in the northwestern Mediterranean Sea and the Rhone River. *Prog Oceanogr.* 1 avr 2018;163:221-31.

99. Yang GCC, Yen CH, Wang CL. Monitoring and removal of residual phthalate esters and pharmaceuticals in the drinking water of Kaohsiung City, Taiwan. *J Hazard Mater.* 30 juill 2014;277:53-61.
100. Schmidt N, Castro-Jiménez J, Fauvelle V, Ourgaud M, Sempéré R. Occurrence of organic plastic additives in surface waters of the Rhône River (France). *Environ Pollut.* 1 févr 2020;257:113637.
101. Notardonato I, Passarella S, Iannone A, Fiore CD, Russo MV, Protano C, et al. Comparison of Two Extraction Procedures, SPE and DLLME, for Determining Plasticizer Residues in Hot Drinks at Vending Machines. *Processes.* sept 2021;9(9):1588.
102. Tienpont B. Determination of phthalates in environmental, food and biomatrices : an analytical challenge [Internet] [dissertation]. Ghent University; 2004 [cité 25 mars 2020]. Disponible sur: <http://hdl.handle.net/1854/LU-540017>
103. Kim MK, Kim KB, Yoon S, Kim HS, Lee BM. Risk assessment of unintentional phthalates contaminants in cosmetics. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1 août 2020;115:104687.
104. Akkbik M, Turksoy VA, Koçoğlu S. Simultaneous quantitative detection of 10 phthalates in PVC children's toys by HPLC-PDA. *Toxicol Mech Methods.* 2 janv 2020;30(1):33-8.
105. Turner C, Waldebäck M. 2 - Principles of pressurized fluid extraction and environmental, food and agricultural applications. In: Rizvi SSH, éditeur. *Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries* [Internet]. Woodhead Publishing; 2013 [cité 6 avr 2022]. p. 39-70. (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845696450500025>
106. Hu A, Qiu M, Liu H, Xu Y, Tao Y, Yang G, et al. Simultaneous determination of phthalate diesters and monoesters in soil using accelerated solvent extraction and ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 30 août 2020;1626:461347.
107. L'extraction par un liquide sous pression (PLE) [Internet]. [cité 26 oct 2021]. Disponible sur: <http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/methodologie/extraction/savoir-plus/14>
108. Thermo Fisher Scientific. Accelerated Solvent Extraction of Plasticizers from Polyvinyl Chloride Polymer - Application Note 336. 2013.
109. Lemos VA, Barreto JA, Santos LB, de Assis R dos S, Novaes CG, Cassella RJ. In-syringe dispersive liquid-liquid microextraction. *Talanta.* 1 févr 2022;238:123002.
110. Quigley A, Cummins W, Connolly D. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction in the

- Analysis of Milk and Dairy Products: A Review. *J Chem.* 31 oct 2016;2016:e4040165.
111. Ranjbari E, Hadjmohammadi MR. Magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of phthalate esters in drinking and environmental water samples. *Talanta.* 15 oct 2012;100:447-53.
112. Casado N, Gañán J, Morante-Zarcero S, Sierra I. New Advanced Materials and Sorbent-Based Microextraction Techniques as Strategies in Sample Preparation to Improve the Determination of Natural Toxins in Food Samples. *Molecules.* janv 2020;25(3):702.
113. Abdel-Rehim M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. *J Chromatogr A.* 16 avr 2010;1217(16):2569-80.
114. Silva C, Cavaco C, Perestrelo R, Pereira J, Câmara JS. Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) and Solid-Phase Microextraction (SPME) as Sample Preparation Procedures for the Metabolomic Profiling of Urine. *Metabolites.* 27 janv 2014;4(1):71-97.
115. Kaur R, Heena, Kaur R, Rani S, Malik AK. Simple and rapid determination of phthalates using microextraction by packed sorbent and gas chromatography with mass spectrometry quantification in cold drink and cosmetic samples. *J Sep Sci.* 2016;39(5):923-31.
116. Li Y, Xian Q, Li L. Development of a short path thermal desorption–gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor air. *J Chromatogr A.* 12 mai 2017;1497:127-34.
117. Kim JW, Kim YM, Moon HM, Hosaka A, Watanabe C, Teramae N, et al. Comparative study of thermal desorption and solvent extraction–gas chromatography–mass spectrometric analysis for the quantification of phthalates in polymers. *J Chromatogr A.* 17 juin 2016;1451:33-40.
118. Laaks J, Jochmann MA, Schmidt TC. Solvent-free microextraction techniques in gas chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 1 janv 2012;402(2):565-71.
119. Panio A, Fabbri Corsarini S, Bruno A, Lasagni M, Labra M, Saliu F. Determination of phthalates in fish fillets by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS): A comparison of direct immersion solid phase microextraction (SPME) versus ultrasonic assisted solvent extraction (UASE). *Chemosphere.* 1 sept 2020;255:127034.
120. Zhang BT, Li HF, Zheng X, Teng Y, Liu Y, Lin JM. Preparation of durable graphene-bonded titanium fibers for efficient microextraction of phthalates from aqueous matrices and analysis with gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 28 nov 2014;1370:9-16.
121. Cao XL. Determination of phthalates and adipate in bottled water by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 18 janv

2008;1178(1):231-8.

122. Burgot G. Microextraction en phase solide (SPME). *Techniques de l'Ingénieur*; 2019.

123. Lirio S, Fu CW, Lin JY, Hsu MJ, Huang HY. Solid-phase microextraction of phthalate esters in water sample using different activated carbon-polymer monoliths as adsorbents. *Anal Chim Acta*. 13 juill 2016;927:55-63.

124. Cacho JJ, Campillo N, Viñas P, Hernández-Córdoba M. Determination of alkylphenols and phthalate esters in vegetables and migration studies from their packages by means of stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 8 juin 2012;1241:21-7.

125. Marín ML, Jiménez A, Berenguer V, López J. Optimization of variables on the supercritical fluid extraction of phthalate plasticizers. *J Supercrit Fluids*. 1 juill 1998;12(3):271-7.

126. Guerra RM, Marín ML, Sánchez A, Jiménez A. Analysis of citrates and benzoates used in poly(vinyl chloride) by supercritical fluid extraction and gas chromatography. *J Chromatogr A*. 15 mars 2002;950(1):31-9.

127. Nerín C, Asensio E, Jiménez C. Supercritical Fluid Extraction of Potential Migrants from Paper and Board Intended for Use As Food Packaging Materials. *Anal Chem*. 1 nov 2002;74(22):5831-6.

128. Perrut M. Extraction par fluide supercritique. *Techniques de l'Ingénieur*; 1999.

129. Bernard L, Décaudin B, Lecoœur M, Richard D, Bourdeaux D, Cuffe R, et al. Analytical methods for the determination of DEHP plasticizer alternatives present in medical devices: A review. *Talanta*. 1 nov 2014;129:39-54.

130. Clausen P, Lindeberg Bille RL, Nilsson T, Hansen V, Svensmark B, Bøwadt S. Simultaneous extraction of di(2-ethylhexyl) phthalate and nonionic surfactants from house dust: Concentrations in floor dust from 15 Danish schools. *J Chromatogr A*. 7 févr 2003;986(2):179-90.

131. Li P, Liang Z hao, Jiang Z, Qiu Z, Du B, Liu Y bing, et al. Supercritical fluid extraction effectively removes phthalate plasticizers in spores of *Ganoderma lucidum*. *Food Sci Biotechnol*. 8 juin 2018;27(6):1857-64.

132. 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*. 1 févr 2017;409(5):1271-80.

133. Andjelković T, Bogdanović D, Kostić I, Kocić G, Nikolić G, Pavlović R. Phthalates leaching from plastic food and pharmaceutical contact materials by FTIR and GC-MS. *Environ*

Sci Pollut Res. 1 juin 2021;28(24):31380-90.

134. Haned Z, Moulay S, Lacorte S. Migration of plasticizers from poly(vinyl chloride) and multilayer infusion bags using selective extraction and GC–MS. *J Pharm Biomed Anal.* 15 juill 2018;156:80-7.

135. Li J, Cai Y, Shi Y, Mou S, Jiang G. Analysis of phthalates via HPLC-UV in environmental water samples after concentration by solid-phase extraction using ionic liquid mixed hemimicelles. *Talanta.* 15 janv 2008;74(4):498-504.

136. Techniques de l'Ingénieur. Glossaire - Supercritique : définition [Internet]. [cité 3 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.techniques-ingenieur.fr/glossaire/supercritique>

137. Lou C, Guo D, Zhang K, Wu C, Zhang P, Zhu Y. Simultaneous determination of 11 phthalate esters in bottled beverages by graphene oxide coated hollow fiber membrane extraction coupled with supercritical fluid chromatography. *Anal Chim Acta.* 12 mai 2018;1007:71-9.

138. Lecoœur M, Decaudin B, Guillotin Y, Sautou V, Vaccher C. 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.* 23 oct 2015;1417:104-15.

139. Vaccher C, Decaudin B, Sautou V, Lecoœur M. Analysis of non-phthalates plasticizers on porous graphitic carbon by supercritical fluid chromatography using evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A.* 12 sept 2014;1359:277-86.

140. Chunin N, Phooplub K, Kaewpet M, Wattanasin P, Kanatharana P, Thavarungkul P, et al. A novel 3D-printed solid phase microextraction device equipped with silver-polyaniline coated pencil lead for the extraction of phthalate esters in cosmeceutical products. *Anal Chim Acta.* 24 déc 2019;1091:30-9.

141. ISO (Organisation internationale de normalisation). Phtalates [Internet]. [iso.org](https://www.iso.org). [cité 11 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.iso.org/fr/search.html>

142. OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin). Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole [Internet]. [oiv.int](http://www.oiv.int). [cité 11 avr 2022]. Disponible sur: <http://www.oiv.int/fr/normes-et-documents-techniques/methodes-danalyse/recueil-des-methodes-internationales-danalyse-des-boissons-spiritueuses-dorigine-vitivinicole>

143. Menet MC. Principes de la spectrométrie de masse. *Rev Francoph Lab.* 1 déc 2011;2011(437):41-53.

144. Bernard L, Bourdeaux D, Pereira B, Azaroual N, Barthélémy C, Breysse C, et al.

Analysis of plasticizers in PVC medical devices: Performance comparison of eight analytical methods. *Talanta*. 1 janv 2017;162:604-11.

145. Celeiro M, Lamas JP, Vila M, Garcia-Jares C, Homem V, Ratola N, et al. Determination of multiclass personal care products in continental waters by solid-phase microextraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 6 déc 2019;1607:460398.

146. Hayasaka Y. Analysis of phthalates in wine using liquid chromatography tandem mass spectrometry combined with a hold-back column: Chromatographic strategy to avoid the influence of pre-existing phthalate contamination in a liquid chromatography system. *J Chromatogr A*. 12 déc 2014;1372:120-7.

147. Zhang YJ, Guo JL, Xue J chuan, Bai CL, Guo Y. Phthalate metabolites: Characterization, toxicities, global distribution, and exposure assessment. *Environ Pollut*. 15 déc 2021;291:118106.

148. Li Z, Wu D, Guo Y, Mao W, Zhao N, Zhao M, et al. Phthalate metabolites in paired human serum and whole blood. *Sci Total Environ*. 10 juin 2022;824:153792.

149. Balicco A, Bidondo ML, Fillol C, Gane J, Oleko A, Saoudi A, et al. Imprégnation de la population française par les phtalates : Programme national de biosurveillance, Esteban 2014-2016 [Internet]. *Santé Publique France*; 2019 [cité 25 oct 2021] p. 52. (Etudes et enquêtes). Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/import/impregnation-de-la-population-francaise-par-les-phtalates-programme-national-de-biosurveillance-esteban-2014-2016>

150. Tan YM, Liao KH, Clewell HJ. Reverse dosimetry: interpreting trihalomethanes biomonitoring data using physiologically based pharmacokinetic modeling. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. nov 2007;17(7):591-603.

151. NICNAS (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme). Dimethyl phthalate. Priority Existing Chemical Assessment Report No.37. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme; 2014 janv p. 60.

152. NICNAS (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme). Diethyl phthalate. Priority Existing Chemical Assessment Report No. 33. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme; 2011 nov p. 94.

153. EPA (Environmental Protection Agency). Survey and health assessment of phthalates in toys and other products for children. The Danish Environmental Protection Agency; 2015 p. 114.

154. NICNAS (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme). Dibutyl phthalate. Priority Existing Chemical Assessment Report No. 36. National Industrial

Chemicals Notification and Assessment Scheme; 2013 nov p. 131.

155. NICNAS (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme). Diethylhexyl Phthalate. Priority Existing Chemical Draft Assessment Report. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme; 2010 juill p. 133.

156. SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks). Scientific Opinion on the safety of medical devices containing DEHP-plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk [Internet]. Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks; 2016 [cité 1 janv 2022] p. 170. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_047.pdf

157. NICNAS (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme). Diisodecyl phthalate, Di-n-octyl phthalate. Priority Existing Chemical Assessment Report 39. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme; 2015 mai p. 65.

158. NICNAS (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme). Diisononyl Phthalate. Priority Existing Chemical Assessment Report No. 35. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme; 2012.

159. Domínguez-Romero E, Scherlinger M. A review of phthalate pharmacokinetics in human and rat: what factors drive phthalate distribution and partitioning? *Drug Metab Rev.* 3 juill 2019;51(3):314-29.

160. Kademoglou K, Giovanoulis G, Palm-Cousins A, Padilla-Sanchez JA, Magnér J, de Wit CA, et al. In Vitro Inhalation Bioaccessibility of Phthalate Esters and Alternative Plasticizers Present in Indoor Dust Using Artificial Lung Fluids. *Environ Sci Technol Lett.* 12 juin 2018;5(6):329-34.

161. Andersen C, Kraus AM, Eriksson AC, Jakobsson J, Löndahl J, Nielsen J, et al. Inhalation and Dermal Uptake of Particle and Gas-Phase Phthalates—A Human Exposure Study. *Environ Sci Technol.* 6 nov 2018;52(21):12792-800.

162. Kraus AM, Andersen C, Eriksson AC, Johnsson E, Nielsen J, Pagels J, et al. Excretion of Urinary Metabolites of the Phthalate Esters DEP and DEHP in 16 Volunteers after Inhalation and Dermal Exposure. *Int J Environ Res Public Health.* 9 nov 2018;15(11):E2514.

163. Wittassek M, Angerer J. Phthalates: metabolism and exposure. *Int J Androl.* 2008;31(2):131-8.

164. Koch HM, Angerer J. Di-iso-nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine after a single oral dose of deuterium-labelled DINP. *Int J Hyg Environ Health.* janv 2007;210(1):9-19.

165. Koch HM, Christensen KLY, Harth V, Lorber M, Brüning T. Di-n-butyl phthalate (DnBP) and diisobutyl phthalate (DiBP) metabolism in a human volunteer after single oral

- doses. *Arch Toxicol.* 1 déc 2012;86(12):1829-39.
166. He R, Li Y, Xiang P, Li C, Zhou C, Zhang S, et al. Organophosphorus flame retardants and phthalate esters in indoor dust from different microenvironments: Bioaccessibility and risk assessment. *Chemosphere.* 1 mai 2016;150:528-35.
167. Jacques C. Étude de la diffusion et du métabolisme cutané de xénobiotiques sur la peau d'oreille de porc maintenue en survie par comparaison avec le foie [Internet] [These de doctorat]. Toulouse 3; 2010 [cité 12 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2010TOU30095>
168. Pan W, Zeng D, Ding N, Luo K, Man Y bon, Zeng L, et al. Percutaneous Penetration and Metabolism of Plasticizers by Skin Cells and Its Implication in Dermal Exposure to Plasticizers by Skin Wipes. *Environ Sci Technol.* 18 août 2020;54(16):10181-90.
169. Elsis AE, Carter DE, Sipes IG. Dermal absorption of phthalate diesters in rats. *Fundam Appl Toxicol Off J Soc Toxicol.* janv 1989;12(1):70-7.
170. Janjua NR, Frederiksen H, Skakkebæk NE, Wulf HC, Andersson AM. Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. *Int J Androl.* 2008;31(2):118-30.
171. Goullé JP, Lhermitte M. Toxicologie industrielle - Toxicocinétique et mécanismes d'action. *Techniques de l'Ingénieur*; 2005.
172. Beydon D, Payan JP, Grandclaude MC. Comparison of percutaneous absorption and metabolism of di-n-butylphthalate in various species. *Toxicol In Vitro.* 1 févr 2010;24(1):71-8.
173. Oishi S, Hiraga K. Distribution and elimination of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) after a single oral administration of DEHP in rats. *Arch Toxicol.* 1 nov 1982;51(2):149-55.
174. Daniel JW, Bratt H. The absorption, metabolism and tissue distribution of di(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicology.* 1 mars 1974;2(1):51-65.
175. Barber ED, Fox JA, Giordano CJ. Hydrolysis, absorption and metabolism of di(2-ethylhexyl) terephthalate in the rat. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst.* mai 1994;24(5):441-50.
176. McKee RH, El-Hawari M, Stoltz M, Pallas F, Lington AW. Absorption, disposition and metabolism of di-isononyl phthalate (DINP) in F-344 rats. *J Appl Toxicol.* 2002;22(5):293-302.
177. ANSES (Agence Nationale Sécurité Sanitaire Alimentaire Nationale). ANSES Opinion on « the development of reprotoxic oral TRVs for three phthalates: diisobutyl phthalate (DIBP), diisooctyl phthalate (DIOP) and di-n-octyl phthalate (DnOP) ». Agence Nationale Sécurité Sanitaire Alimentaire Nationale; 2017 juill p. 8.

178. CPSC (Consumer Product Safety Commission). Toxicity Review for Benzyl-n-butyl Phthalate (Benzyl Butyl Phthalate or BBP). Consumer Product Safety Commission; 2010 p. 38.
179. INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité). Phtalate de benzyle et de butyle. Fiche toxicologique n°317. Institut National de Recherche et de Sécurité; 2017 juill p. 12.
180. NICNAS (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme). Diisononyl Phthalate. Existing Chemical Hazard Assessment Report. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme; 2008 juin p. 47.
181. ECHA (European Chemicals Agency). 1,2-benzenedicarboxylic acid, di-C9-11-branched alkyl esters, C10-rich and di-“isodecyl” phthalate (DIDP). Summary risk assessment report. European Chemicals Agency; 2003 p. 26.
182. ECHA (European Chemicals Agency). Trinonyl benzene-1,2,4-tricarboxylate. Registration Dossier [Internet]. ECHA. 2017 [cité 9 janv 2022]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/17482/7/2/1>
183. CPSC (Consumer Product Safety Commission). Toxicity Review for Trioctyltrimellitate (TOTM). Consumer Product Safety Commission; 2018 août p. 38.
184. INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale). Chapitre 33-Exposition des populations. In: Reproduction et environnement, Rapport Paris : Les éditions Inserm 2011. INSERM. 2011. p. 89. (Expertise collective).
185. Tanaka A, Adachi T, Takahashi T, Yamaha T. Biochemical studies on phthalic esters I. Elimination, distribution and metabolism of di-(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicology*. mai 1975;4(2):253-64.
186. Deisinger PJ, Perry LG, Guest D. In Vivo Percutaneous Absorption of [14C]DEHP from [14C]DEHP-Plasticized Polyvinyl Chloride Film in Male Fischer 344 Rats 11 Portions of this study were presented at the February 1991 meeting of the Society of Toxicology, and appear in abstract form in *Toxicologist*, 1991, 11, 1, Abstract 293. *Food Chem Toxicol*. 1 juin 1998;36(6):521-7.
187. Ringbeck B, Bury D, Gotthardt A, Hayen H, Otter R, Weiss T, et al. Human metabolism and urinary excretion kinetics of di-n-butyl adipate (DnBA) after oral and dermal administration in three volunteers. *Toxicol Lett*. 1 juin 2021;343:11-20.
188. Sugino M, Hatanaka T, Todo H, Mashimo Y, Suzuki T, Kobayashi M, et al. Safety evaluation of dermal exposure to phthalates: Metabolism-dependent percutaneous absorption. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1 août 2017;328:10-7.
189. Doan K, Bronaugh RL, Yourick JJ. In vivo and in vitro skin absorption of lipophilic compounds, dibutyl phthalate, farnesol and geraniol in the hairless guinea pig. *Food Chem*

Toxicol. 1 janv 2010;48(1):18-23.

190. Pelling D, Phillips JC, Cunninghame ME. Absorption of hydrophilic and lipophilic compounds through epidermal and subepidermal strata of rat skin in vitro. *Toxicol In Vitro*. 10 janv 1997;12(1):47-55.

191. Mint A, Hotchkiss SAM, Caldwell J. Percutaneous absorption of diethyl phthalate through rat and human skin in vitro. *Toxicol In Vitro*. 1 avr 1994;8(2):251-6.

192. Höllerer C, Becker G, Göen T, Eckert E. Human metabolism and kinetics of tri-(2-ethylhexyl) trimellitate (TEHTM) after oral administration. *Arch Toxicol*. 1 sept 2018;92(9):2793-807.

193. INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale). IV Phtalates. In: *Reproduction et environnement, Rapport Paris : Les éditions Inserm 2011*. INSERM. 2011. p. 89. (Expertise collective).

194. Frederiksen H, Skakkebaek NE, Andersson AM. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(7):899-911.

195. Chang WH, Herianto S, Lee CC, Hung H, Chen HL. The effects of phthalate ester exposure on human health: A review. *Sci Total Environ*. 10 sept 2021;786:147371.

196. Lessmann F, Schütze A, Weiss T, Brüning T, Koch HM. Determination of metabolites of di(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHTP) in human urine by HPLC-MS/MS with on-line clean-up. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1 févr 2016;1011:196-203.

197. Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Kato K, Malek NA, Hodge CC, et al. Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch Toxicol*. 1 oct 2003;77(10):561-7.

198. 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*. juill 2005;79(7):367-76.

199. Martis L, Freid E, Woods E. Tissue distribution and excretion of tri-(2-ethylhexyl)trimellitate in rats. *J Toxicol Environ Health*. 1 avr 1987;20(4):357-66.

200. Sol CM, Santos S, Asimakopoulos AG, Martinez-Moral MP, Duijts L, Kannan K, et al. Associations of maternal phthalate and bisphenol urine concentrations during pregnancy with childhood blood pressure in a population-based prospective cohort study. *Environ Int*. mai 2020;138:105677.

201. Mariana M, Feiteiro J, Verde I, Cairrao E. The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review. *Environ Int*. 1 sept 2016;94:758-76.

202. Mariana M, Cairrao E. Phthalates Implications in the Cardiovascular System. *J*

Cardiovasc Dev Dis. 22 juill 2020;7(3):26.

203. Axelsson J, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Lindh CH, Jönsson BAG, Giwercman A. Prenatal phthalate exposure and reproductive function in young men. *Environ Res.* avr 2015;138:264-70.

204. Ferguson KK, Rosen EM, Rosario Z, Feric Z, Calafat AM, McElrath TF, et al. Environmental phthalate exposure and preterm birth in the PROTECT birth cohort. *Environ Int.* 1 nov 2019;132:105099.

205. Yuan XQ, Du YY, Liu C, Guo N, Teng XM, Hua X, et al. Phthalate metabolites and biomarkers of oxidative stress in the follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Sci Total Environ.* 10 oct 2020;738:139834.

206. Capela D, Mhaouty-Kodja S. Effects of pubertal exposure to low doses of di-(2-ethylhexyl)phthalate on reproductive behaviors in male mice. *Chemosphere.* 1 janv 2021;263:128191.

207. Chiang C, Flaws JA. Subchronic Exposure to Di(2-ethylhexyl) Phthalate and Diisononyl Phthalate During Adulthood Has Immediate and Long-Term Reproductive Consequences in Female Mice. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* 1 avr 2019;168(2):620-31.

208. Khasin LG, Della Rosa J, Petersen N, Moeller J, Kriegsfeld LJ, Lishko PV. The Impact of Di-2-Ethylhexyl Phthalate on Sperm Fertility. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:426.

209. Adir M, Combelles CMH, Mansur A, Ophir L, Hourvitz A, Orvieto R, et al. Dibutyl phthalate impairs steroidogenesis and a subset of LH-dependent genes in cultured human mural granulosa cell in vitro. *Reprod Toxicol Elmsford N.* avr 2017;69:13-8.

210. Saillénfait AM, Sabaté JP, Robert A, Cossec B, Roudot AC, Denis F, et al. Adverse effects of diisooctyl phthalate on the male rat reproductive development following prenatal exposure. *Reprod Toxicol.* 1 déc 2013;42:192-202.

211. Ma T, Zhou Y, Xia Y, Jin H, Wang B, Wu J, et al. Environmentally relevant perinatal exposure to DBP disturbs testicular development and puberty onset in male mice. *Toxicology.* juill 2021;459:152860.

212. Mathieu-Denoncourt J, Wallace SJ, de Solla SR, Langlois VS. Plasticizer endocrine disruption: Highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mammalian aquatic species. *Gen Comp Endocrinol.* 1 août 2015;219:74-88.

213. Muczynski V. Polluants environnementaux et développement du testicule foetal humain: effets et mécanismes des phtalates [Internet] [These de doctorat]. Université Paris 11; Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00631554/document>

214. Milošević N, Milanović M, Sudji J, Bosić Živanović D, Stojanoski S, Vuković B, et al.

Could phthalates exposure contribute to the development of metabolic syndrome and liver disease in humans? *Environ Sci Pollut Res Int.* janv 2020;27(1):772-84.

215. INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité). Phtalate de diisononyle. Fiche toxicologique n°245. Institut National de Recherche et de Sécurité; 2017 juill p. 10.

216. Zhao JF, Hsiao SH, Hsu MH, Pao KC, Kou YR, Shyue SK, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arch Toxicol.* janv 2016;90(1):181-90.

217. Lee KI, Chiang CW, Lin HC, Zhao JF, Li CT, Shyue SK, et al. Maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure deregulates blood pressure, adiposity, cholesterol metabolism and social interaction in mouse offspring. *Arch Toxicol.* mai 2016;90(5):1211-24.

218. Tsai CF, Hsieh TH, Lee JN, Hsu CY, Wang YC, Lai FJ, et al. Benzyl butyl phthalate induces migration, invasion, and angiogenesis of Huh7 hepatocellular carcinoma cells through nongenomic AhR/G-protein signaling. *BMC Cancer.* 1 août 2014;14(1):556.

219. Yost EE, Euling SY, Weaver JA, Beverly BEJ, Keshava N, Mudipalli A, et al. Hazards of diisobutyl phthalate (DIBP) exposure: A systematic review of animal toxicology studies. *Environ Int.* avr 2019;125:579-94.

220. Weaver JA, Beverly BEJ, Keshava N, Mudipalli A, Arzuaga X, Cai C, et al. Hazards of diethyl phthalate (DEP) exposure: A systematic review of animal toxicology studies. *Environ Int.* déc 2020;145:105848.

221. Ito Y, Nakamura T, Yanagiba Y, Ramdhan DH, Yamagishi N, Naito H, et al. Plasticizers May Activate Human Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Less Than That of a Mouse but May Activate Constitutive Androstane Receptor in Liver. *PPAR Res.* 2012;2012:201284.

222. Ito Y, Kamijima M, Nakajima T. Di(2-ethylhexyl) phthalate-induced toxicity and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a review. *Environ Health Prev Med.* 6 juill 2019;24(1):47.

223. Eveillard A, Mselli-Lakhal L, Mogha A, Lasserre F, Polizzi A, Pascussi JM, et al. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) activates the constitutive androstane receptor (CAR): A novel signalling pathway sensitive to phthalates. *Biochem Pharmacol.* 1 juin 2009;77(11):1735-46.

224. Ito Y, Yamanoshita O, Asaeda N, Tagawa Y, Lee CH, Aoyama T, et al. Di(2-ethylhexyl)phthalate induces hepatic tumorigenesis through a peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent pathway. *J Occup Health.* mai 2007;49(3):172-82.

225. Kamijo Y, Hora K, Nakajima T, Kono K, Takahashi K, Ito Y, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Protects against Glomerulonephritis Induced by Long-Term

- Exposure to the Plasticizer Di-(2-Ethylhexyl)Phthalate. *J Am Soc Nephrol.* 1 janv 2007;18(1):176-88.
226. Wu CT, Wang CC, Huang LC, Liu SH, Chiang CK. Plasticizer Di-(2-Ethylhexyl)Phthalate Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Renal Fibrosis In Vitro and In Vivo. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* 1 juill 2018;164(1):363-74.
227. Wei Z, Song L, Wei J, Chen T, Chen J, Lin Y, et al. Maternal exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate alters kidney development through the renin-angiotensin system in offspring. *Toxicol Lett.* 20 juill 2012;212(2):212-21.
228. Sun WL, Zhu YP, Ni XS, Jing DD, Yao YT, Ding W, et al. Potential involvement of Fgf10/Fgfr2 and androgen receptor (AR) in renal fibrosis in adult male rat offspring subjected to prenatal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP). *Toxicol Lett.* 5 janv 2018;282:37-42.
229. Mezni I, Galichon P, Bacha MM, Sfar I, Hertig A, Goucha R, et al. La transition épithélio-mésenchymateuse et la fibrose du transplant rénal. *médecine/sciences.* 1 janv 2015;31(1):68-74.
230. Gu Y, Gao M, Zhang W, Yan L, Shao F, Zhou J. Exposure to phthalates DEHP and DINP May lead to oxidative damage and lipidomic disruptions in mouse kidney. *Chemosphere.* mai 2021;271:129740.
231. Liang F, Yan B. Oxidative damage in the liver and kidney induced by dermal exposure to diisononyl phthalate in Balb/c mice. *Toxicol Ind Health.* janv 2020;36(1):30-40.
232. Zhao S, Pan L, Chen M, Zhu YP, Han BM, Xia SJ, et al. In utero di-n-butyl phthalate exposure induced abnormal autophagy in renal tubular cells via hedgehog signaling in newborn rats. *Chem Biol Interact.* 1 sept 2020;328:109189.
233. Chen Y, Li C, Song P, Yan B, Yang X, Wu Y, et al. Hepatic and renal tissue damage in Balb/c mice exposed to diisodecyl phthalate: The role of oxidative stress pathways. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* oct 2019;132:110600.
234. Trasande L, Liu B, Bao W. Phthalates and attributable mortality: A population-based longitudinal cohort study and cost analysis. *Environ Pollut.* 1 janv 2022;292:118021.
235. Deng T, Xie X, Duan J, Chen M. Exposure to diisononyl phthalate induced an increase in blood pressure through activation of the ACE/ AT1R axis and inhibition of NO production. *Toxicol Lett.* juill 2019;309:42-50.
236. Posnack NG, Swift LM, Kay MW, Lee NH, Sarvazyan N. Phthalate exposure changes the metabolic profile of cardiac muscle cells. *Environ Health Perspect.* sept 2012;120(9):1243-51.
237. Posnack NG, Idrees R, Ding H, Jaimes R, Stybayeva G, Karabekian Z, et al. Exposure

- to phthalates affects calcium handling and intercellular connectivity of human stem cell-derived cardiomyocytes. *PloS One*. 2015;10(3):e0121927.
238. Jaimes R, Swiercz A, Sherman M, Muselimyan N, Marvar PJ, Posnack NG. Plastics and cardiovascular health: phthalates may disrupt heart rate variability and cardiovascular reactivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 nov 2017;313(5):H1044-53.
239. Aitoufella H, Maury E, Guidet B, Offenstadt G. L'endothélium : un nouvel organe. *Réanimation*. mars 2008;17(2):126-36.
240. Deng T, Xie X, Duan J, Chen M. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induced an increase in blood pressure via activation of ACE and inhibition of the bradykinin-NO pathway. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. avr 2019;247:927-34.
241. Xie X, Deng T, Duan J, Ding S, Yuan J, Chen M. Comparing the effects of diethylhexyl phthalate and dibutyl phthalate exposure on hypertension in mice. *Ecotoxicol Environ Saf*. 15 juin 2019;174:75-82.
242. Kim SM, Yoo JA, Baek JM, Cho KH. Diethyl phthalate exposure is associated with embryonic toxicity, fatty liver changes, and hypolipidemia via impairment of lipoprotein functions. *Toxicol In Vitro*. 25 déc 2015;30(1, Part B):383-93.
243. Tedgui A, Mallat Z. Athérosclérose et inflammation. *médecine/sciences*. 2001;17(2):162.
244. Wang J, Liao Y, Fan J, Ye T, Sun X, Dong S. Apigenin inhibits the expression of IL-6, IL-8, and ICAM-1 in DEHP-stimulated human umbilical vein endothelial cells and in vivo. *Inflammation*. août 2012;35(4):1466-76.
245. Liu N, Jiang L, Sun X, Yao X, Zhai X, Liu X, et al. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induced ROS-dependent autophagic cell death in human vascular endothelial cells. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. oct 2017;44:49-56.
246. Ban JB, Fan XW, Huang Q, Li BF, Chen C, Zhang HC, et al. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces injury in human umbilical vein endothelial cells. *PloS One*. 2014;9(5):e97607.
247. Wu X, Jiang L, Sun X, Yao X, Bai Y, Liu X, et al. Mono(2-ethylhexyl) phthalate induces autophagy-dependent apoptosis through lysosomal-mitochondrial axis in human endothelial cells. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. août 2017;106(Pt A):273-82.
248. Stanic B, Kokai D, Tesic B, Fa S, Samardzija Nenadov D, Pogrmic-Majkic K, et al. Integration of data from the in vitro long-term exposure study on human endothelial cells and the in silico analysis: A case of dibutyl phthalate-induced vascular dysfunction. *Toxicol Lett*. 1 mars 2022;356:64-74.

249. Faulkner A, Lynam E, Purcell R, Jones C, Lopez C, Board M, et al. Context-dependent regulation of endothelial cell metabolism: differential effects of the PPAR β/δ agonist GW0742 and VEGF-A. *Sci Rep.* 12 mai 2020;10(1):7849.
250. Wang R, Wang M, Ye J, Sun G, Sun X. Mechanism overview and target mining of atherosclerosis: Endothelial cell injury in atherosclerosis is regulated by glycolysis (Review). *Int J Mol Med.* janv 2021;47(1):65-76.
251. ECHA (European Chemicals Agency). Comprendre REACH - Législation [Internet]. ECHA. [cité 11 janv 2022]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/fr/regulations/reach/understanding-reach>
252. ECHA (European Chemicals Agency). Information sur les produits chimiques - Liste d'autorisations [Internet]. ECHA. [cité 11 janv 2022]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/fr/authorisation-list>
253. Arrêté du 25 avril 2008 modifiant l'arrêté du 2 janvier 2003 relatif aux matériaux et objets en matière plastique mis ou destinés à être mis au contact des denrées, produits et boissons alimentaires [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000019108464/2021-03-29>
254. Directive Européenne n°2007-19 du 30 mars 2007 de la Commission portant modification de la directive 2002/72/CE concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires et de la directive 85/572/CEE du Conseil fixant la liste des simulants à utiliser pour vérifier la migration des constituants des matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000518901>
255. Règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj/fra>
256. Décret n° 2006-1361 du 9 novembre 2006 relatif à la limitation de l'emploi de certains phtalates dans les jouets et les articles de puériculture [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/LEGITEXT000006054690/>
257. Arrêté du 30 avril 2009 relatif aux conditions de mise sur le marché des produits de construction et de décoration contenant des substances cancérigènes, mutagènes ou reprotoxiques de catégorie 1 ou 2 [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000020671607/>
258. Directive déléguée (UE) 2015/863 de la Commission du 31 mars 2015 modifiant

l'annexe II de la directive 2011/65/UE du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne la liste des substances soumises à limitations (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. Disponible sur: http://data.europa.eu/eli/dir_del/2015/863/oj/fra

259. Règlement (UE) 2018/1513 de la Commission du 10 octobre 2018 modifiant l'annexe XVII du règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), en ce qui concerne certaines substances cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction (CMR) des catégories 1A ou 1B (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE.) [Internet]. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/reg/2018/1513/oj/fra>

260. ECHA (European Chemicals Agency). Restrictions on the manufacture, placing on the market and use of certain dangerous substances, mixtures and articles. Entry 51 (Annex XVII to REACH) [Internet]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/documents/10162/aaa92146-a005-1dc2-debe-93c80b57c5ee>

261. ECHA (European Chemicals Agency). Cosmetic Products Regulation, Annex II - Prohibited Substances - Information sur les produits chimiques [Internet]. ECHA. [cité 11 janv 2022]. Disponible sur: https://echa.europa.eu/fr/cosmetics-prohibited-substances?p_p_id=eucleflegislationlist_WAR_euclefportlet&p_p_lifecycle=0

262. ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé). Étiquetage relatif aux phtalates dans un dispositif médical, Avis aux fabricants. 2016.

263. Règlement (UE) 2017/745 du Parlement européen et du Conseil du 5 avril 2017 relatif aux dispositifs médicaux, modifiant la directive 2001/83/CE, le règlement (CE) n° 178/2002 et le règlement (CE) n° 1223/2009 et abrogeant les directives du Conseil 90/385/CEE et 93/42/CEE (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32017R0745>

264. LOI n° 2012-1442 du 24 décembre 2012 visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A (1) [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000026830015/>

265. Information réglementaire - Substitution des phtalates [Internet]. INERIS. [cité 11 janv 2022]. Disponible sur: <https://substitution-phtalates.ineris.fr/fr/information-reglementaire>

266. Arrêté du 13 avril 2017 fixant les niveaux de concentration en di-(2-éthylhexyl) phtalate au-dessus desquels l'utilisation de tubulures qui en comportent est interdite en application de l'article L. 5214-1 du code de la santé publique [Internet]. Disponible sur:

<https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000034449871/>

267. Perinaud A, Jarrouj Souleibi C, Franck L, Gnamien S. Interdiction du DEHP dans les services de pédiatrie : applicable ou pas ? *Pharm Hosp Clin*. 1 mars 2016;51(1):75-6.
268. Genay S, Luciani C, Décaudin B, Kambia N, Dine T, Azaroual N, et al. Experimental study on infusion devices containing polyvinyl chloride: To what extent are they di(2-ethylhexyl)phthalate-free? *Int J Pharm*. 30 juin 2011;412(1):47-51.
269. Santana J, Giraudi C, Marengo E, Robotti E, Pires S, Nunes I, et al. Preliminary toxicological assessment of phthalate esters from drinking water consumed in Portugal. *Environ Sci Pollut Res Int*. janv 2014;21(2):1380-90.
270. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part III. *J Pharm Biomed Anal*. 21 sept 2007;45(1):82-96.
271. Feinberg M. La méthode du profil d'exactitude - Fiche pratique (Ref 1420). *Techniques de l'Ingénieur*; 2015.
272. HMEC-1 (CRL-3243TM) [Internet]. ATCC. [cité 16 févr 2022]. Disponible sur: <https://www.atcc.org/products/crl-3243>
273. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*. 1 mars 1969;27(3):502-22.
274. Ortega-Higueruelo FJ, Langa F. Selective Screening of Biological Thiols by Means of an Unreported Magenta Interaction and Evaluation Using Smartphones. *ACS Omega*. 30 juin 2018;3(6):6617-23.
275. Juarez-Facio AT, Martin de Lagarde V, Monteil C, Vaugeois JM, Corbiere C, Rogez-Florent T. Validation of a Fast and Simple HPLC-UV Method for the Quantification of Adenosine Phosphates in Human Bronchial Epithelial Cells. *Molecules*. janv 2021;26(20):6324.
276. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. nov 1951;193(1):265-75.
277. Martínez I, Herrera A, Tames-Espinosa M, Bondyale-Juez DR, Romero-Kutzner V, Packard TT, et al. Protein in marine plankton: A comparison of spectrophotometric methods. *J Exp Mar Biol Ecol*. 1 mai 2020;526:151357.
278. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 7 mai 1976;72:248-54.

279. Employer Payment for Personal Protective Equipment; Final Rule | Occupational Safety and Health Administration [Internet]. [cité 10 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.osha.gov/laws-regs/federalregister/2007-11-15-0>
280. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol.* déc 1992;99(6):683-90.
281. Muñoz-Vega M, Massó F, Páez A, Carreón-Torres E, Cabrera-Fuentes HA, Frago JM, et al. Characterization of immortalized human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) for the study of HDL functionality. *Lipids Health Dis.* 9 mars 2018;17(1):44.
282. Ahmadpour D, Mhaouty-Kodja S, Grange-Messent V. Disruption of the blood-brain barrier and its close environment following adult exposure to low doses of di(2-ethylhexyl)phthalate alone or in an environmental phthalate mixture in male mice. *Chemosphere.* nov 2021;282:131013.
283. Yang G, Gao X, Jiang L, Sun X, Liu X, Chen M, et al. 6-Gingerol prevents MEHP-induced DNA damage in human umbilical vein endothelial cells. *Hum Exp Toxicol.* nov 2017;36(11):1177-85.
284. Eljezi T, Pinta P, Richard D, Pinguet J, Chezal JM, Chagnon MC, et al. In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line. *Chemosphere.* avr 2017;173:452-9.
285. Liu H, Huang H, Xiao X, Zhao Z, Liu C. Effects of Phthalate Esters (PAEs) on Cell Viability and Nrf2 of HepG2 and 3D-QSAR Studies. *Toxics.* juin 2021;9(6):134.
286. Krüger T, Cao Y, Kjærgaard SK, Knudsen LE, Bonefeld-Jørgensen EC. Effects of phthalates on the human corneal endothelial cell line B4G12. *Int J Toxicol.* août 2012;31(4):364-71.
287. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene.* 15 déc 2015;574(2):193-203.
288. Chen YH, Wu YJ, Chen WC, Lee TS, Tsou TC, Chang HC, et al. MEHP interferes with mitochondrial functions and homeostasis in skeletal muscle cells. *Biosci Rep.* 17 avr 2020;40(4):BSR20194404.
289. Wagner N, Wagner KD. PPARs and Angiogenesis-Implications in Pathology. *Int J Mol Sci.* 10 août 2020;21(16):E5723.
290. Zhang L, Sun W, Duan X, Duan Y, Sun H. Promoting differentiation and lipid metabolism are the primary effects for DINP exposure on 3T3-L1 preadipocytes. *Environ*

Pollut. 1 déc 2019;255:113154.

291. Cousins I, Mackay D. Correlating the physical-chemical properties of phthalate esters using the « three solubility » approach. *Chemosphere*. nov 2000;41(9):1389-99.

292. PubChem [Internet]. Banque de données américaine de molécules chimiques. [cité 19 févr 2022]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

293. ECHA (European Chemicals Agency). ECHA [Internet]. Agence européenne des produits chimiques. [cité 19 févr 2022]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/>

ANNEXES

Annexe I : Répartition des plastifiants en pourcentage de la dose appliquée au niveau cutané

Composé administré	Espèce étudiée (étude)	Dose appliquée (administration)	Échantillon de peau étudié (mesure effectuée)	Pourcentage de la dose administrée		Nature du compartiment receveur	Source
				Couche cutanée	Compartiment receveur		
¹⁴ C]-DEP	Rat (<i>in vitro</i>)	16,3 à 20,6 mg/cm ² (unique, sans rinçage avant la fin de l'exposition)	Peau entière (72h après l'administration)	39%	38%	Solution saline	Mint <i>et al.</i> , 1994 (191)
	Homme (<i>in vitro</i>)	16,3 à 20,6 mg/cm ² (unique, sans rinçage avant la fin de l'exposition)	Peau entière (72h après l'administration)	13%	5%	Solution saline	Mint <i>et al.</i> , 1994 (191)
¹⁴ C]-DBP	Cochon d'Inde (<i>in vivo</i>)	1 mg/cm ² (unique, sans rinçage avant la fin de l'exposition)	Peau entière (24h après l'administration)	2%	62%	Ensemble regroupant les fractions urinaires, les organes et la carcasse	Doan <i>et al.</i> , 2010 (189)
	Cochon d'Inde (<i>in vitro</i>)	1 mg/cm ² (unique, sans rinçage avant la fin de l'exposition)	Peau entière (24h après l'administration)	29%	27%	Solution saline	Doan <i>et al.</i> , 2010 (189)
	Cochon d'Inde (<i>in vitro</i>)	1 mg/cm ² (unique, avec rinçage à 24h d'exposition)	Peau entière (72h après l'administration)	16%	60%	Solution saline	Doan <i>et al.</i> , 2010 (189)
¹⁴ C]-DEHP	Rat (<i>in vitro</i>)	ND (unique, sans rinçage avant la fin de l'exposition)	Epiderme (72h après l'administration)	59%	2%	Solution saline	Pelling <i>et al.</i> , 1998 (190)
	Rat (<i>in vitro</i>)	ND (unique, sans rinçage avant la fin de l'exposition)	Derme (72h après l'administration)	29%	< 2%	Solution saline	Pelling <i>et al.</i> , 1998 (190)

Annexe II : Récapitulatif des mesures réglementaires en vigueur pour les plastifiants

Composé	CAS	Liste des substances soumises à autorisation	Liste des substances soumises à restriction	Jouets et article de puériculture	Matériaux au contact des denrées alimentaires	Produits cosmétiques	Produits de construction et de décoration	Équipements électriques et électroniques	Produits textiles, vêtements, accessoires connexes et chaussures
Phtalate de di-n-octyle (DNOP)	117-84-0	non	oui	<0,1% (a)	non	non	non	non	non
Phtalate de diisononyle (DINP)	28553-12-0 ou 68515-48-0	non	oui	<0,1% (a)	LMS = 9 mg/kg (b)	non	non	non	non
Phtalate de diisodécyle (DIDP)	26761-40-0 ou 68515-49-1	non	oui	<0,1% (a)	LMS = 9 mg/kg (b)	non	non	non	non
Phtalate de diisobutyle (DIBP)	84-69-5	oui	oui	non	Interdiction totale	0%	non	<0,1%	non
Phtalate de dibutyle (DBP)	84-74-2	oui	oui	<0,1%	LMS = 0,3 mg/kg (b)	0%	<1 µg/m ³	<0,1%	non
Phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP)	117-81-7	oui	oui	<0,1%	LMS = 1,5 mg/kg (b)	0%	<1 µg/m ³	<0,1% (c)	non
Phtalate de benzyle et de butyle (BBP)	85-68-7	oui	oui	<0,1%	LMS = 30 mg/kg (b)	0%	non	<0,1%	non
Phtalate de N-pentyl-isopentyle	776297-69-9	oui	non	non	non	0%	non	non	non
Phtalate de dipentyle	131-18-0	oui	non	non	non	0%	non	non	oui
Phtalate de diisopentyle	605-50-5	oui	non	non	non	0%	non	non	≤1000 mg/kg
Phtalate de diisooctyle	27554-26-3	non	non	non	non	0%	non	non	non
Phtalate de diisohexyle	71850-09-4	non	non	non	non	0%	non	non	non
Phtalate de diisoheptyle	71888-89-6	oui	non	non	non	0%	non	non	≤1000 mg/kg
Phtalate de dihexyle	84-75-3	oui	non	non	non	0%	non	non	≤1000 mg/kg
Phtalate de dicyclohexyle	84-61-7	non	non	non	non	0%	non	non	non
Phtalate de bis(2-méthoxyéthyle)	117-82-8	oui	non	non	non	0%	non	non	≤1000 mg/kg

Composé	CAS	Liste des substances soumises à autorisation	Liste des substances soumises à restriction	Jouets et article de puériculture	Matériaux au contact des denrées alimentaires	Produits cosmétiques	Produits de construction et de décoration	Équipements électriques et électroniques	Produits textiles, vêtements, accessoires connexes et chaussures
Mélange de phtalate de n-décyle n-octyle (50 % p/p), de phtalate de di-n-décyle (25 % p/p) et de phtalate de di-n-octyle (25 % p/p)	/	non	non	non	LMS = 5 mg/kg (b)	non	non	non	non
Acide benzènedicarboxylique-1,2, esters de dipentyles, ramifiés et linéaires	84777-06-0	oui	non	non	non	0%	non	non	non
Acide benzènedicarboxylique-1,2, esters de dihexyles, ramifiés et linéaires	68515-50-4	oui	non	non	non	0%	non	non	non
Acide benzènedicarboxylique-1,2, esters de dialkyles en C9-11, ramifiés, riches en C10	68515-49-1	non	oui	non	non	non	non	non	non
Acide benzènedicarboxylique-1,2, esters de dialkyles en C8-10, ramifiés, riche en C9	68515-48-0	non	oui	non	non	non	non	non	non
Acide benzènedicarboxylique-1,2, esters de dialkyles en C7-11, ramifiés et linéaires	68515-42-4	oui	non	non	non	0%	non	non	non
Acide 1,2-benzènedicarboxylique, esters de dialkyles en C6-10 ou acide 1,2-benzènedicarboxylique, mélange de diesters de décyle, d'hexyle et d'octyle avec > ou égal à 0,3 % de phtalate de dihexyle	68648-93-1 ou 68515-51-5	oui	non	non	non	non	non	non	non

(a) : Seuil concernant uniquement les jouets et articles de puériculture pouvant être mis à la bouche par les enfants

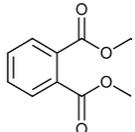
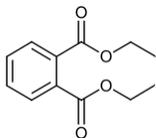
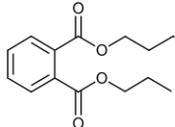
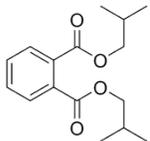
(b) : Limite de migration spécifique du plastifiant (LMS)

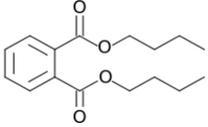
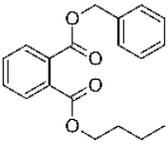
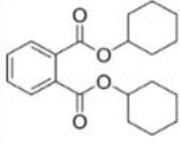
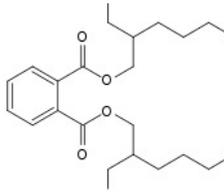
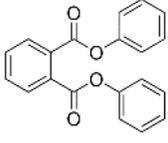
(c) : Dérogation pour certains composants en caoutchouc sous conditions, jusqu'au 22 juillet 2024 au plus tard

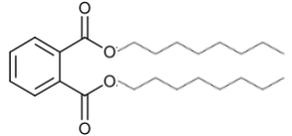
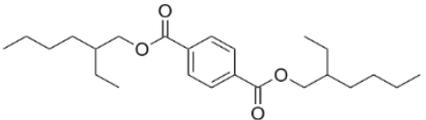
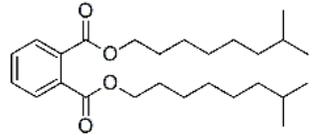
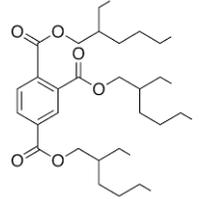
Annexe III : Caractéristiques des plastifiants étudiés

Plastifiant	Acronyme	Dénomination IUPAC	Formule brute	N° CAS	Masse molaire (g/mol)
Phtalate de diméthyle	DMP	1,2-dimethyl benzene-1,2-dicarboxylate	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	131-11-3	194,18
Phtalate de diéthyle	DEP	1,2-diethyl benzene-1,2-dicarboxylate	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	84-66-2	222,24
Phtalate de dipropyle	DPP	Dipropyl benzene-1,2-dicarboxylate	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	131-16-8	250,29
Phtalate de diisobutyle	DIBP	1,2-bis(2-methylpropyl) benzene-1,2-dicarboxylate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	84-69-5	278,34
Phtalate de dibutyle	DBP	1,2-dibutyl benzene-1,2-dicarboxylate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	84-74-2	278,34
Phtalate de benzyle et de butyle	BBP	1-benzyl 2-butyl benzene-1,2-dicarboxylate	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	85-68-7	312,36
Phtalate de dicyclohexyle	DCHP	1,2-dicyclohexyl benzene-1,2-dicarboxylate	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	84-61-7	330,42
Phtalate de bis(2-éthylhexyle)	DEHP	1,2-bis(2-ethylhexyl) benzene-1,2-dicarboxylate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	117-81-7	390,56
Phtalate de diphényle	DphP	1,2-diphenyl benzene-1,2-dicarboxylate	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	84-62-8	318,32
Phtalate de di-n-octyle	DNOP	1,2-dioctyl benzene-1,2-dicarboxylate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	117-84-0	390,56
Téréphtalate de bis(2-éthylhexyle)	DEHT	1,4-bis(2-ethylhexyl) benzene-1,4-dicarboxylate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	6422-86-2	390,56
Phtalate de diisononyle	DINP	1,2-Benzenedicarboxylic acid, di-C8-10 branched alkylesters, C9 rich	C ₂₆ H ₄₂ O ₄	28553-12-0	418,61
Trimellitate de trioctyle	TOTM	1,2,4-tris(2-ethylhexyl) benzene-1,2,4-tricarboxylate	C ₃₃ H ₅₄ O ₆	3319-31-1	546,78

Annexe IV : Tableau regroupant les propriétés physico-chimiques, la classification CMR et les quantités enregistrées pour chaque plastifiant

Plastifiant	Formule topologique	Coefficient de partage (a, b)	Point d'ébullition (b, c)	Classification (c)		Quantités enregistrées (tonnes/an) (c)
				CMR	Phrase de risque	
DMP		1,54	283,1 °C	Non	/	1 000 – 10 000
DEP		2,2	297,3°C	Non	/	1 000 – 10 000
DPP		3,40	317,5°C	Oui	Repr.2 : H361	ND
DIBP		4,11	320°C	Oui	Repr.1B : H360	0 – 10

Plastifiant	Formule topologique	Coefficient de partage (a, b)	Point d'ébullition (b, c)	Classification (c)		Quantités enregistrées (tonnes/an) (c)
				CMR	Phrase de risque	
DBP		4,46	340°C	Oui	Repr.1B : H360	1 000 – 10 000
BBP		4,84	370°C	Oui	Repr.1B : H360	1 – 10
DCHP		4,82	322°C	Oui	Repr.1B : H360	100 – 1 000
DEHP		7,14 – 7,45	374,2°C	Oui	Repr.1B : H360	10 000 – 100 000
DphP		ND	ND	Non	/	ND

Plastifiant	Formule topologique	Coefficient de partage (a, b)	Point d'ébullition (b, c)	Classification (c)		Quantités enregistrées (tonnes/an) (c)
				CMR	Phrase de risque	
DNOP		7,73	ND	Non	/	ND
DEHT		8,39	375°C	Non	/	100 000 – 1 000 000
DINP		8,8 – 9,7	> 300°C	Non	/	100 000 – 1 000 000
TOTM		8	355°C	Non	/	10 000 – 100 000

(a) : Cousins *et al.* (2000) (291)

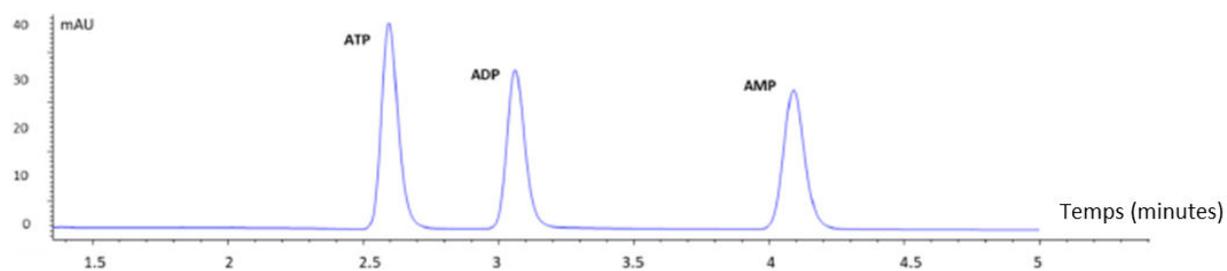
(b) : PubChem (292)

(c) : ECHA (293)

ND : Non déterminé

Annexe V : Paramètres de validation HPLC pour les adénosines phosphates cellulaires

HPLC-DAD						
Analyte	Gamme d'étalonnage (en μM)	Droite d'étalonnage	LOD (en μM)	LOQ (en μM)	Recouvrement (en %)	CV (en %)
ATP	[0,2-10]	$y = 35,21x - 0,7885$	0,054	0,18	110,4	2,9
ADP	[0,2-10]	$y = 28,9x - 0,1143$	0,060	0,20	97,8	8,1
AMP	[0,2-10]	$y = 30,5x - 0,5111$	0,051	0,17	110,5	5,1



Solution standard du mélange des adénosines phosphates (ATP, ADP et AMP) injecté en HPLC-DAD (source : Juarez-Facio *et al.*, 2021 (275))

Résumé

Titre : Les plastifiants dans les gants à usage professionnel : de l'analyse de leur composition à l'évaluation de leur toxicité endothéliale par une approche *in vitro*

Mots clés : Gants ; Phtalates ; Plastifiants ; Toxicologie ; Chimie analytique ; Culture cellulaire ; Cellules endothéliales microvasculaires

Résumé : Les plastifiants sont principalement utilisés pour conférer des propriétés de plasticité à la matière plastique. L'exposition humaine aux plastifiants se caractérise par un contexte de multi-exposition car ils entrent dans la composition de nombreux produits de consommation. Malgré l'absence de composition sur l'emballage des boîtes de gants, il n'en demeure pas moins que la présence des plastifiants a été appuyée par les résultats de différentes études. Pourtant, les plastifiants sont des substances chimiques pointées du doigt. Plusieurs études ont documenté l'implication des plastifiants dans différentes toxicités d'organes dont les maladies cardiovasculaires. Dans ce contexte, la première partie de ce travail de thèse a consisté à développer des outils analytiques afin de déterminer la composition en plastifiants dans les gants, pour pallier le manque d'information. Deux méthodes analytiques orthogonales (GC-MS et HPLC-DAD) ont été développées et validées pour la caractérisation des plastifiants dans les gants. Leur application aux échantillons de gants a permis d'identifier sept plastifiants sur les treize sélectionnés (DMP, DEP, DIBP, DBP, DEHP, DINP et DEHT). Les teneurs massiques peuvent atteindre 44% (m/m). Alors que le DEHP est une substance classée en raison de sa toxicité présumée pour la reproduction humaine, il a néanmoins été quantifié dans tous les échantillons. Les résultats de cette étude soulignent que le port de gants constitue une source d'exposition aux plastifiants en milieu professionnel. La connaissance de la présence des plastifiants, pouvant atteindre des teneurs massiques élevées, suscite des inquiétudes au regard de leur relargage car ils ne sont pas liés de manière covalente. Ainsi, un relargage peut survenir lors du port de gants, ce qui représente un risque d'exposition cutanée aux plastifiants. Cela peut s'accompagner d'une absorption qui s'ajoute à celle d'autres voies et sources. Cela pose donc la question de leur toxicité endothéliale car la distribution des plastifiants au sein de l'organisme est médiée par la circulation sanguine. Cependant les effets au niveau endothélial sont peu étudiés. Dans ce cadre, la toxicité *in vitro* a été évaluée pour les plastifiants majoritairement quantifiés dans les gants, en utilisant une lignée de cellules humaines endothéliales (HMEC-1). Ils ont été testés individuellement et en mélange (DEHP, DEHT et DINP). Une cytotoxicité induite par les plastifiants a été observée pour toutes les conditions, excepté pour le DEHT. La respiration mitochondriale est une cible de l'action des plastifiants, car une diminution de la consommation mitochondriale d'oxygène et une augmentation du métabolisme glycolytique ont été conjointement observées. Ces effets ont été observés de manière rapide pour le DEHP à la suite d'une exposition aiguë (3 h) par rapport au mélange et au DINP (24 h et 48 h respectivement). Cependant, les répercussions sur le fonctionnement cellulaire (glutathion total, ratio ATP/ADP) ne sont pas immédiates. L'ensemble de ces résultats suggère un mécanisme d'adaptation des cellules endothéliales impliquant les voies métaboliques.

Pour conclure, les résultats issus de ce travail de thèse apportent de nouvelles informations concernant les plastifiants, autant en ce qui concerne la composition des gants que leurs effets au niveau endothélial. Les résultats obtenus soulignent l'intérêt de poursuivre les recherches sur les plastifiants afin de mieux caractériser le risque associé au port de gants et les mécanismes de toxicité impliqués au niveau endothélial. Dans ce cadre, les protocoles expérimentaux devront s'attacher à étudier les effets mélange pour refléter au mieux les conditions réelles d'exposition.

Abstract

Title: Evaluation of plasticizers used in protective gloves: an analysis of their content and an *in vitro* approach to assess their endothelial toxicity

Keywords: Gloves ; Phthalates ; Plasticizers; Toxicology ; Analytical chemistry ; Cell culture ; Microvascular endothelial cells

Abstract: Plasticizers are chemicals of high demand used in a wide range of commercial products to improve plasticity properties. Human exposure occurs through multiple pathways from numerous sources as they have been reported in a wide range of commercial products. Although gloves composition is not characterized, several studies have identified plasticizers in glove samples. Plasticizers are controversial chemicals because many studies have reported their multiple-induced organ toxicity such as cardiovascular diseases. In this context, analytical developments were conducted in order to identify and to quantify the content of plasticizers in protective gloves. To that purpose, two orthogonal methods, (i.e., GC–MS and HPLC–DAD) were developed and validated for their application to protective gloves. The analysis of glove samples revealed the presence of a total of seven out of the thirteen studied plasticizers (i.e., DMP, DEP, DIBP, DBP, DEHP, DINP and DEHT). The content of plasticizers in gloves can be high as it can reach up to 44% (w/w). Although DEHP is a known reproductive toxicant (CMR 1B), it was quantified in all the studied gloves. Results showed that gloves are a real source of exposure to plasticizers and exposed to a variety of compounds. Thus, protective gloves appear to be a real source of dermal exposure in the workplace. Knowing that the content of plasticizer can be significant in gloves, it raises concern of leach out during glove handling because they are not covalently bound. Indeed, plasticizers release could end up to human exposure, and thus may lead to their absorption. This is a matter of particular concern as the vascular system distributes plasticizers throughout the body and therefore these substances can interact with the endothelium. But data on their endothelial effects are scarce. In that regard, *in vitro* endothelial toxicity was assessed based on the results of gloves analyses, the main plasticizers were tested both individually and in mixture (DEHP, DEHT and DINP). Plasticizers-induced cytotoxicity were observed for all the conditions tested, except for DEHT. Mitochondrial respiration is a target of plasticizers, because a depletion of mitochondrial ATP production coupled to oxygen consumption and an increase of glycolytic metabolism occurred concomitantly. The effect was rapid for DEHP with a short-term exposure time (at 3 h) whereas it was less sudden for the mixture and DINP (respectively at 24 h and 48 h). However, cell function impairments (total glutathione and ratio ATP/ADP) were noted with a delayed-time manner in comparison to mitochondrial parameters. Altogether, these results suggest that endothelial cell could induce an adaptation mechanism through metabolic pathways.

To sum up, this thesis work provides additional data about plasticizers contents in gloves and showed that they can induce an endothelial dysfunction. These results stress the need for more research on the subject to fulfil knowledge gap for both risk assessment of plasticizers from protective gloves and to better understand their toxicological mechanisms in endothelial cells. Experimental design with mixture effects is needed to better reflect real-life exposure.