

**anses**

agence nationale de sécurité sanitaire  
alimentation, environnement, travail



# Connaissances relatives aux données de toxicité sur les composés de la famille des Phtalates (Tome 3)

Note d'accompagnement  
Rapport d'étude

Mars 2015

Édition scientifique

**anses**

agence nationale de sécurité sanitaire  
alimentation, environnement, travail



# Connaissances relatives aux données de toxicité sur les composés de la famille des Phtalates (Tome 3)

Note d'accompagnement

Rapport d'étude

Mars 2015

Édition scientifique

Maisons-Alfort, le 24 mars 2015

## **Note**

### **relative à l'état des connaissances sur les usages, les sources d'exposition et la toxicité de plusieurs perfluorés et phtalates**

#### **Présentation de la question posée et organisation de l'expertise**

L'Agence a été saisie en juin 2009 par la Direction générale de la santé (DGS) (saisine 2009-SA-0331) afin d'évaluer les risques sanitaires (ERS) liés à l'exposition à des substances reprotoxiques de catégorie 3<sup>1</sup> (R3) (selon la directive 67/548/CE) et/ou perturbatrices endocriniennes (PE) présentes dans des produits de consommation mis sur le marché en France. Cette demande d'expertise visait la population générale, incluant les populations vulnérables, et les personnes en milieu de travail manipulant des produits de consommation dits «grand public» du fait de leur activité professionnelle, hors fabrication, transformation, distribution et élimination. Parmi l'ensemble des substances soumises à l'expertise figurait une liste de 10 substances de la famille des phtalates et 2 substances de la famille des perfluorés.

Ces substances sont les suivantes :

- Perfluorés : perfluorooctane sulfonate (PFOS) (CAS n° 1763-23-1, 29081-56-9, 2795-39-3), acide de perfluorooctane (PFOA) (CAS n° 335-67-1).
- Phtalates : butylbenzylphtalate (BBP) (CAS n° 85-68-7), di-(2-ethylhexyl)phtalate (DEHP) (CAS n° 117-81-7), diisodecyl phtalate (DIDP) (CAS n° 26761-40-0), di-n-butylphtalate (DBP) (CAS n° 84-74-2), diisononyl phtalate = 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisononyl ester (DINP) (CAS n° 28553-12-0), di isopentylphtalate (DIIP) (CAS n° 131-18-0), mono-n-butylphtalate (CAS n° 131-70-4), dipropylphtalate (CAS n° 131-16-8), diisobutylphtalate (DIBP) (CAS n° 84-69-5), di-n-hexylphtalate (CAS n° 84-75-3).

D'autres perfluorés et phtalates ne figurant pas dans cette liste peuvent cependant être présents dans des articles ou produits de consommation ou dans différents compartiments de l'environnement.

---

<sup>1</sup> Les substances classées reprotoxiques de catégorie 3 selon la directive 67/548/CEE sont désormais classées toxiques pour la reproduction de catégorie 2 selon le règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges dit CLP (Classification, Labelling, Packaging). Dans ce document, la classification est indiquée selon le règlement CLP.

L'Anses a donc considéré, en accord avec ses instances d'expertise (Groupe de travail (GT) sur les perturbateurs endocriniens, Comité d'experts spécialisé (CES) «Evaluation des risques des substances chimiques» et «Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence»), qu'il convenait de recenser les données disponibles sur une liste élargie de composés chimiques de ces deux familles (cf.infra) pour en documenter les usages, les réglementations en vigueur, les expositions et les dangers. L'agence a également considéré que les sources d'exposition potentielle à ces substances devaient inclure l'alimentation, l'eau, l'air, et les poussières.

La présente note présente succinctement les principaux chapitres des deux rapports issus de l'expertise collective, l'un sur plusieurs perfluorés, l'autre sur plusieurs phtalates réunissant les données disponibles ou en cours d'acquisition concernant leurs usages, les niveaux de contamination de différents produits ou compartiments de l'environnement et les dangers potentiels liés à ces substances.

Ce travail se donnait pour but *in fine* de caractériser les principaux effets toxiques en lien avec une exposition à ces composés et de déterminer les sources principales d'exposition humaine. Il a permis d'identifier les substances pour lesquelles une évaluation des risques sanitaires se justifie du fait de leurs usages étendus et/ou de leur persistance dans l'organisme humain ou dans l'environnement et du fait de leur toxicité potentielle, notamment vis-à-vis du développement et des fonctions de la reproduction.

## Résultat de l'expertise

### 1. Composés perfluorés

#### PFOS et PFOA

Depuis mai 2009, le PFOS et le PFOA font partie de la liste des substances couvertes par la convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants (POP). Leur production, mise sur le marché et leur utilisation soit en tant que telles, soit dans des préparations, soit sous forme de constituants d'articles sont interdites sauf dérogation (règlement 850/2004 concernant les polluants organiques persistants et modifiant la directive 79/117/CEE).

Le PFOS a été identifié comme substance dangereuse prioritaire dans l'annexe X de la directive du parlement européen et du conseil du 12 août 2013<sup>2</sup>. Aujourd'hui, la présence de PFOS dans l'environnement résulte davantage des activités et usages antérieurs que de foyers de production actuels. En effet, le principal fabricant de cette molécule (Société 3M) a arrêté sa synthèse en 2002. Il n'existerait plus aujourd'hui de production de PFOS ni en Europe ni en Amérique du nord. Cependant, une dérogation d'usage existe en Europe pour certaines applications (Directive 2006/122/ECOF du 12 décembre 2006). Par contre, la production de PFOS subsiste dans d'autres pays dont la Chine.

Le PFOA bénéficie depuis le 2 octobre 2013 d'une classification harmonisée R1B. Le PFOA est principalement utilisé pour produire son sel d'ammonium (APFO), utilisé comme tensio-actif dans la fabrication des deux principaux fluoropolymères: le polytétrafluoroéthylène (PTFE) et polyvinylidène fluorure (PVDF).

Par ailleurs le PFOA peut être un sous-produit fortuit de fabrication de ces fluoropolymères et les substances de type fluorotélomère peuvent se dégrader en acides carboxyliques perfluorés ou en acides sulfoniques perfluorés. Les fluorotélomères peuvent se dégrader en PFOA.

<sup>2</sup> Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau.

**Autres perfluorés considérés dans la présente expertise (cf. tableau ci-dessous) :**

Famille	Abréviation	Numéro CAS	Nom de la molécule
Carboxylates d'alkyls perfluorés (PFCA)	PFBA	375-22-4	Acide perfluorobutanoïque
	PFPA	2706-90-3	Acide perfluoropentanoïque
	PFHxA	307-24-4	Acide perfluorohexanoïque
	PFHpA	375-85-9	Acide perfluoroheptanoïque
	PFOA	335-67-1	Acide perfluorooctanoïque
	NH <sub>4</sub> -PFOA	3825-26-1	Sel d'ammonium de l'acide perfluorooctanoïque
	PFNA	375-95-1	Acide perfluorononanoïque
	PFDA	335-76-2	Acide perfluorodécanoïque
	PFUnA	2058-94-8	Acide perfluoroundécanoïque
	PFDoA	307-55-1	Acide perfluorododécanoïque
	PFTTrDA	72629-94-8	Acide perfluorotridécanoïque
	PFTeDA	376-06-7	Acide perfluorotétradécanoïque
Sulfonates d'alkyls perfluorés (PFSA)	PFBS	375-73-5	Sulfonate de perfluorobutane
	PFPS	2706-91-4	Sulfonate de perfluoropentane
	PFHxS	355-46-4	Sulfonate de perfluorohexane
	PFHpS	375-92-8	Sulfonate de perfluoroheptane
	PFOS	1763-23-1	Sulfonate de perfluorooctane
	PFDS	335-77-3	Sulfonate de perfluorodécane
Autres	PFHxPA	40143-76-8	Acide perfluorohexylphosphonique
	PFOPA	40143-78-0	Acide perfluorooctylphosphonique
	PFDPA	52299-26-0	Acide perfluorodécylphosphonique
	PFOSA	754-91-6	Sulfonamide de perfluorooctane
	PPVE	1623-05-8	Ether perfluoropropyl perfluorovinyle
	EtFOSA	4151-50-2	N-Éthyl perfluorooctane sulfonamide
	MeFOSA	31506-32-8	N-Méthyl perfluorooctane sulfonamide

Dans la suite de la présente note, les substances polyfluoroalkylées et perfluoroalkylées sont désignées sous l'acronyme PFAS.

La majeure partie des articles contenant des composés perfluorés sont fabriqués en dehors du marché européen et il est difficile d'obtenir des informations spécifiques sur les perfluorés présents dans les articles importés.

Des données récentes montrent par ailleurs une diminution importante des perfluorés dans les produits commercialisés au cours de ces dernières années. Le PFOS est cependant toujours présent dans certains produits. En particulier, des données récentes de l'US-EPA suggèrent que des produits liquides d'entretien de tapis, cires et produits d'étanchéité de sols traités, des papiers traités destinés à un contact avec des denrées alimentaires, ainsi que des pâtes et rubans d'étanchéité constituent les sources les plus importantes de composés perfluorés, dont le PFOA, parmi les dix catégories d'articles étudiés aux Etats-Unis (sources US-EPA<sup>3</sup>). Par ailleurs, selon ces auteurs, les composés perfluorés à chaîne courte (C4 à C7) seraient plus utilisés que les composés à chaîne longue (C8 à C12) mais cette tendance devra être confirmée par des études de marché.

**Teneurs en perfluorés dans différents produits et milieux**

Depuis 2002, une baisse des niveaux de PFOS et PFOA dans l'environnement (aliments, air, poussières) est rapportée dans une étude scandinave<sup>4</sup>, contrairement aux dérivés sulfonés à courte chaîne. Le manque de données physico-chimiques ainsi que de références analytiques pour des composés autres que PFOS et PFOA constituent toutefois un frein à l'étude de ces substances chez l'Homme et dans l'environnement.

<sup>3</sup> 4.4.2 US- EPA: Trends of perfluoroalkyl Acid Content in Articles of Commerce – Market Monitoring from 2007 through 2011 (août 2012)

<sup>4</sup> Nordic Council of Ministers\* (2013) Per- and polyfluorinated substances in the Nordic Countries. Use, occurrence and toxicology. pp. 230.

**Concernant les contaminations alimentaires**, une faible contamination des aliments a été observée dans l'étude nationale de l'alimentation totale (EAT2, Anses, 2011b<sup>5</sup>). Des concentrations inférieures à limite de détection ont été rapportées dans 98% des échantillons testés dans cette étude). Les poissons, et plus particulièrement les poissons d'eau douce, sont les denrées alimentaires les plus contaminées (échantillonnage spécifique des poissons d'eau douce avec l'étude ICAR-PCB<sup>6</sup>, des produits de la mer avec l'étude CALIPSO<sup>7</sup>). En conséquence, les forts consommateurs de poissons d'eau douce sont les plus exposés, suivis par les forts consommateurs de produits de la mer.

**Concernant la contamination dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH)** : les PFAS ne font pas partie des paramètres soumis à l'obligation du contrôle sanitaire des EDCH. A ce jour, les données nationales sont issues des travaux du Laboratoire d'hydrologie de l'Anses de Nancy (LHN), publiées dans le rapport de mai 2011 relatif aux campagnes nationales d'occurrence des composés alkyls perfluorés dans les eaux brutes et distribuées. D'autres campagnes de prélèvement et d'analyse, dites «exceptionnelles», ont été réalisées à la demande de la Direction de l'eau et de la biodiversité (DEB) du Ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie (MEDDE) dont les résultats n'ont pas encore fait l'objet d'une publication :

- en 2011 sur les eaux souterraines en métropole par le BRGM;
- en 2012 sur les eaux de surface dans les DOM et en métropole et sur les eaux souterraines dans les DOM.

**Concernant la contamination dans l'air (intérieur et extérieur) et des poussières** : les résultats de la recherche bibliographique montrent que :

- la majorité des études recensées dans la littérature concerne le PFOS et le PFOA. Parmi les autres composés perfluorés étudiés, le PFOSA, le PFBS, le PFHxS, le PFHxA, le PFHpA, le PFNA, le 6 : 2 FTOH, le 8 : 2 FTOH, le 10 : 2 FTOH, le MeFOSA, l'EtFOSA, le MeFOSE et l'EtFOSE sont ceux faisant l'objet du plus grand nombre de publications ;
- les données de contamination de l'air intérieur et des poussières se rapportent principalement aux logements. Quelques études présentent également des données de contamination dans d'autres environnements intérieurs (bureaux, magasins *etc.*). Les gammes de concentrations mesurées dans ces deux médias sont assez larges ;
- plusieurs publications présentant des données de contamination dans l'air extérieur ont pour objectif l'étude du transport à longue distance des composés perfluorés. Dans ces études, les mesures ont pu être réalisées dans des territoires ruraux et isolés. Les gammes de concentrations mesurées dans l'air extérieur sont assez larges. Les composés perfluorés neutres, plus volatils, ont fait l'objet de davantage de publications ;
- seules deux études présentant des données de contamination dans les poussières domestiques et l'air extérieur en France ont été identifiées dans la littérature scientifique pour le PFOS, le PFOA, le PFHxS, le MeFOSA, l'EtFOSA, le MeFOSE, l'EtFOSE (air extérieur et poussières), le PFOSA (poussières uniquement), le PFBS, le PFNA, le PFDA, le PFDS, le 6 : 2 FTOH, le 8 : 2 FTOH et le 10 : 2 FTOH (air extérieur uniquement).

<sup>5</sup> Anses (2011b) Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT2). Tome 1. Contaminants inorganiques, minéraux, polluants organiques persistants, mycotoxines, phyto-œstrogènes. ISBN 978-2-11-128112-7. 305 p.

<sup>6</sup> ICAR-PCB : Étude nationale d'imprégnation aux polychlorobiphényles des consommateurs de poissons d'eau douce, menée en 2009. Denys S1, et al.. *Toxicol Lett.* 2014 Dec 1;231(2):233-8.

<sup>7</sup> CALIPSO : Étude des consommations alimentaires de produits de la mer et imprégnation aux éléments traces, polluants et oméga 3, menée en 2004.

Des calculs d'exposition agrégée sont présentés dans le rapport d'expertise, qui ont été réalisés dans l'objectif de déterminer les sources principales d'exposition à certains composés perfluorés. Les média d'exposition pris en compte dans ces calculs sont :

- Les aliments et les boissons - exposition par ingestion
- Les poussières déposées dans les environnements intérieurs - exposition par ingestion
- Le compartiment aérien - exposition par inhalation

Les résultats du calcul de la Dose journalière d'exposition (DJE) présentée dans le rapport d'expertise permettent d'approcher la contribution des différentes voies d'exposition (scénario moyen).

A noter que la qualité des données utilisées pour ces calculs diffère d'un médium à l'autre :

- les données d'exposition par la voie alimentaire sont issues de données individuelles françaises, les données de contamination dans l'air et les poussières sont des données issues de la bibliographie.

### **Données de biosurveillance**

Concernant les études de biosurveillance, plusieurs éléments d'ordre méthodologique liés à la mesure quantitative des PFAS dans les matrices biologiques représentent une source d'hétérogénéité, ce qui rend difficile leur comparaison directe. Les seuils de détection, la gestion des valeurs non détectées, ou encore la prise en compte des formes linéaires et ramifiées de certains composés, sont notamment des points critiques pouvant avoir une influence sur les résultats des distributions des concentrations mesurées dans la population.

Le PFOS et le PFOA sont les deux principaux biomarqueurs d'exposition aux acides carboxyliques perfluorés (PFCA) cités dans la littérature. Ce sont aussi les deux composés parmi l'ensemble des perfluorés qui sont le plus systématiquement recherchés. Ils contribuent selon les études, à 75-90 % du profil d'exposition, même si celui-ci dépend du nombre d'autres substances recherchées. D'autres composés comme le PFHxS, le PFNA et le PFDA sont également fréquemment recherchés et détectés dans de nombreuses études. Les PFDoA, PFUnA, PFHpA et PFTrDA constituent un autre ensemble de substances détectées essentiellement dans des études menées sur le continent asiatique. On observe une variabilité relativement importante des proportions relatives entre les différents PFAS recherchés, notamment en fonction de l'origine géographique des prélèvements collectés. Les autres représentants de cette famille de substances, en particulier leurs précurseurs (dérivés du PFOSA/PFOSE, fluorotélomères) sont beaucoup plus rarement recherchés et/ou détectés.

Dans le sérum de sujets adultes, les teneurs de PFOA et PFOS observées au niveau international sont globalement de l'ordre de quelques  $\mu\text{g/l}$  à quelques dizaines de  $\mu\text{g/l}$ . L'existence d'une exposition fœtale et post-natale est également démontrée. Dans le sang du cordon, les niveaux mesurés sont toutefois environ 1,2 à 3 fois inférieurs à ceux mesurés dans le sang maternel, selon la substance considérée. Dans le lait maternel, les concentrations observées sont environ plus de 10 fois inférieures à celles mesurées dans le sérum maternel.

Les taux de transfert de la mère au fœtus (sang du cordon, liquide amniotique) ou au nourrisson (lait maternel) sont variables d'une substance à une autre, en lien notamment avec leurs propriétés structurales, physico-chimiques et pharmacocinétiques. Ce transfert est ainsi plus important pour le PFOA que pour le PFOS. Les formes ramifiées, les chaînes de longueur courte, et les groupements fonctionnels carboxylates favorisent ce transfert, comparativement aux formes linéaires, aux formes à chaîne longues, et à celles comportant des groupements sulfonates.

Une tendance à la diminution des niveaux d'imprégnation biologique en population générale est observée pour ce qui concerne le PFOS et ce, sur plusieurs continents depuis 2002, date correspondant à l'arrêt de l'une des principales sociétés de production. Cette tendance n'est néanmoins pas observée s'agissant du PFOA pour lequel les études publiées montrent des résultats contradictoires. Des niveaux d'imprégnation biologique dus à d'autres substances de la famille des perfluorés sont par ailleurs en augmentation depuis la dernière décennie (PFNA, PFHxS).

Les études sur les imprégnations biologiques à ces divers composés montrent des résultats contradictoires et mettent en évidence l'influence de divers facteurs tels que l'âge, le sexe ... La diversité des sources d'exposition, la variabilité des profils d'exposition dans le temps, ainsi que les polymorphismes individuels au niveau de certains paramètres pharmacocinétiques, sont autant d'éléments pouvant contribuer à cette non-convergence d'observations.

Si le volume de données disponibles paraît relativement important pour le PFOS et le PFOA, une amélioration de la caractérisation de cette classe de substances dans toute sa diversité, depuis les formulations techniques jusqu'aux produits de dégradation de ceux-ci, serait nécessaire afin de mieux appréhender cette famille de contaminants dans toute sa complexité. La prise en considération plus systématique des formes précurseurs (fluorotélomères, dérivés PFOSE/PFOA) et la distinction des formes linéaires et ramifiées sont deux exemples d'axes de travail qui seraient à approfondir.

Les résultats de deux études (étude Elfe<sup>8</sup> et programme ANR CONTREPERF) conduites en France sont attendus en 2015 qui devraient permettre de rendre compte de niveaux d'imprégnation chez des mères et leurs enfants.

## Données de toxicité

**Des études épidémiologiques** ont rapporté un effet possible des composés perfluorés - sans pouvoir l'attribuer spécifiquement au PFOS ou au PFOA - sur la fertilité des couples (augmentation du risque d'infécondité involontaire). Un effet sur la morphologie spermatique a été suggéré dans une unique étude humaine et appelle à la nécessité de réaliser de nouveaux travaux reposant sur une approche longitudinale. Pour ce qui concerne les autres événements de santé faisant partie du champ de cette expertise, les données sont trop limitées pour permettre de caractériser un effet éventuel des composés perfluorés.

**Des études expérimentales** récentes confirment les effets des PFOS et PFOA. La glande mammaire semble être l'organe le plus sensible au PFOA, notamment lors d'expositions *in utero*. La période peri-pubertaire constitue également une période sensible vis-à-vis des effets des perfluorés. PFOS et PFOA exceptés, très peu d'autres composés de la famille des perfluorés ont fait l'objet d'études permettant d'évaluer leur toxicité. Il convient de souligner les différences de sensibilité des espèces animales vis-à-vis des perfluorés. Depuis l'expertise de l'Inserm (2011), de nouvelles études sur la toxicité des perfluorés ont été publiées. Ces études feront l'objet d'une expertise par l'Anses.

Des valeurs de dose journalière tolérable (DJT) pour le PFOS égale à 150 ng/kg/jour et, pour le PFOA, à 1500 ng/kg/jour ont été proposées par l'EFSA en 2008. Ces valeurs, en cours d'évaluation par l'Anses, apparaissent significativement supérieures aux valeurs d'exposition évaluées et disponibles dans la littérature (Inserm, 2011<sup>9</sup>).

<sup>8</sup> <http://www.elfe-france.fr/index.php/fr/>

<sup>9</sup> Rapport d'expertise collective de l'Inserm sur « reproduction et environnement » publié en 2011 qui s'appuie sur les données scientifiques disponibles en date du second semestre 2010 ; le chapitre VIII traite des composés perfluorés



## 2. Composés phtalates

Les phtalates sont utilisés dans la fabrication de certains produits de consommation notamment dans les produits utilisant des matières plastiques comme le PVC. Certains usages sont soumis à des réglementations sectorielles comme par exemple les jouets, matériaux et objets en caoutchouc au contact des denrées, produits et boissons alimentaires, les produits biocides et phytosanitaires, les produits cosmétiques, produits de construction et de décoration, et les articles de puériculture. Un intérêt croissant pour les phtalates à longue chaîne (supérieure à 7 atomes de carbone) peut être observé. En effet, des données récentes montrent une diminution importante de l'usage des phtalates à chaîne courte, pour lesquels la réglementation a conduit à des restrictions d'usage au niveau européen dans les produits au cours des dernières années. Les phtalates à chaîne longue, encore peu soumis à des restrictions, semblent ainsi constituer à ce jour une alternative aux composés à chaîne courte.

A la liste des dix phtalates mentionnés dans la saisine de la DGS (cf. supra) l'Anses a considéré sur la base des auditions de représentants de l'industrie de la plasturgie et de chercheurs spécialisés dans le domaine de la toxicologie de la reproduction, que d'autres composés justifiaient d'être soumis à l'expertise soit d'un point de vue toxicologique soit sur le versant de leurs usages.

Il s'agit des substances suivantes : di-propyl-heptylphtalate (DPHP) (CAS n° 53306-54-0), diisoundecylphtalate (DIUP) (CAS n° 26761-40-0), dicyclohexylphtalate (DCHP) (CAS n° 84-61-7), diisooctylphtalate (DIOP) (CAS n° 27554-26-3), ditridecylphtalate (DTDP) (CAS n° 119-06-2), di-n-heptylphtalate (DHPP) (CAS n° 3648-21-3), di-iso-heptylphtalate (DiHP) (CAS n° 71888-89-6), di-n-octylphtalate (DnOP) (CAS n° 117-84-0), di-undecylphtalate (DUP) (CAS n° 3648-20-2), diallyl-phtalate (DAP), butyl-octylphtalate (DBzP (CAS n° 523-31-9), dipropylphtalate (DiPrP) (CAS n° 605-45-8)).

En France, une étude de filières a été conduite par l'Anses qui a permis de mettre en évidence les points suivants :

- Phtalates à chaîne courte : aucun usage spécifique n'a été identifié pour le Mono-n-butyl phtalate (MnBP), dipropylphtalate (DPP) di-n-hexylphtalate (DnHP), di-n-pentylphtalate (DnPP). A noter que le mono-n-butyl phtalate (MnBP) est un métabolite biologique du DBP et du BBP, ce qui explique qu'aucun usage n'a été identifié pour ce composé lors de l'étude de filières. D'après les réponses des industriels à l'enquête de filières, les di-2-ethylhexyl)phtalate (DEHP), le dibutylphtalate (DBP), di-isobutylphtalate (DIBP) et le butylbenzylphtalate (BBP) sont majoritairement utilisées, en tant que plastifiants, qui par la suite sont mis en œuvre dans différents articles en caoutchouc, des colles, des aménagements intérieurs (revêtements de sol et de mur, câbles, rideaux de douches, tissus enduits..) des poches plastiques, des couvertures d'agendas.
- Phtalates à chaîne longue : plusieurs usages ont été identifiés pour le di-isononylphtalate (DINP), le di-isodecylphtalate (DIDP) et le di-propylheptylphtalate (DPHP). Ils sont notamment utilisés dans le caoutchouc, et dans de nombreux autres secteurs d'activités et usages (colles, mastics, etc.).

Il conviendrait de confirmer cette tendance par une étude de filières actualisée et portant plus spécifiquement sur les composés pour lesquels peu d'informations sont disponibles.

## Teneurs en phtalates dans différents produits et milieux

**Concernant les contaminations alimentaires et dans les eaux destinées à la consommation humaine**, les données déjà disponibles ou en cours d'acquisition permettront, pour certains composés de la famille des phtalates, de savoir s'ils sont présents ou non dans les aliments ainsi que dans les EDCH. Les résultats des études en cours permettront de mieux quantifier l'exposition d'origine alimentaire dont l'eau de consommation humaine. Cependant, un certain nombre de phtalates de nouvelle génération n'ont pas fait l'objet de ce type d'étude. Des travaux sont conduits à l'Agence sous l'égide du Laboratoire d'hydrologie de Nancy afin de caractériser au niveau national les teneurs en phtalates dans les eaux distribuées et les eaux embouteillées.

**Concernant les contaminations dans l'air (intérieur et extérieur) et des poussières**, il existe des données françaises dans les logements et les écoles pour le BBP, le DBP, le DEHP, le DiBP et le DiNP. Le di-éthylphtalate (DEP), le di-méthylphtalate (DMP) et le di-méthyléthylphtalate (DMEP) (non ciblés dans la saisine de la DGS) ont également été mesurés dans ces études. D'autres études en cours permettront de disposer, d'ici 2015-2016, de données d'exposition à ces phtalates à l'échelle du parc national des résidences principales d'une part, et du parc des écoles maternelles et élémentaires d'autre part (France continentale dans les deux cas). Par ailleurs, peu de données de contamination dans l'air extérieur ont été identifiées dans la littérature scientifique.

Pour ce qui concerne les phtalates n'ayant pas fait l'objet de mesures dans ces milieux en France :

- Compte tenu du peu d'informations obtenues lors de l'enquête de filières sur le DnPP, le DnHP, le DPP, et le DPHP, il conviendrait de confirmer l'utilisation de ces substances en France, afin d'évaluer le besoin d'acquérir des données d'exposition. Cette recommandation s'applique également aux phtalates n'ayant pas fait l'objet d'une étude de filières (DiUP, DCHP, DiOP et DTDP).
- Concernant le DiDP, des mesures dans l'air et les poussières en France peuvent d'ores et déjà être recommandées au regard des résultats de l'enquête de filières.
- Dans l'attente de disposer de mesures réalisées en France, il pourrait être envisagé d'évaluer la qualité des études disponibles dans les autres pays et la possibilité d'extrapoler leurs résultats à la situation française, en vue de leur utilisation pour de futurs travaux d'expertise.

### Données de biosurveillance

Certains composés phtalates peuvent générer des métabolites communs dont le suivi à travers les études de biosurveillance peut s'avérer complexe.

- L'ensemble des données d'exposition devrait permettre d'identifier les populations à risque, par exemple les individus avec des comportements, des habitudes alimentaires ou des activités professionnels conduisant à des situations d'exposition potentiellement à risque.
- Des données sont disponibles concernant l'imprégnation biologique de la population française par le DEHP, le DBP etc (étude ELFE). Toutefois une meilleure caractérisation de cette classe de substances dans toute sa diversité, depuis les formulations techniques jusqu'aux produits de dégradation de ceux-ci, est nécessaire afin d'appréhender cette famille de contaminants dans toute sa complexité<sup>10</sup>.

<sup>10</sup> <http://www.elfe-france.fr/index.php/fr/>

## Données de toxicité

Les substances phtalates à longues chaînes sont généralement considérées comme étant moins toxiques comparativement aux composés à chaînes courtes (<C8), même si peu d'études documentent leurs effets sur l'environnement et sur l'Homme. Les données sont toutefois encore très insuffisantes dans ce domaine.

- Concernant les études expérimentales, les études récentes relatives aux effets des phtalates sur l'appareil reproducteur mâle soulèvent certaines questions :  
Alors que les valeurs toxicologiques de référence des phtalates sont souvent fondées sur l'effet anti-androgénique de ces produits chez le fœtus de rat mâle, un nombre croissant de données montre, que l'activité androgénique du testicule fœtal ne serait pas affectée par les phtalates chez l'homme. Cela interroge sur la pertinence de l'extrapolation à l'Homme des données expérimentales obtenues chez le rat.
- La revue des études *in vivo* sur l'impact possible des phtalates sur l'obésité et le métabolisme suggère qu'une analyse exhaustive de la littérature devra être réalisée pour préciser le potentiel obésogène des phtalates mais également l'impact sur la survenue d'autres troubles métaboliques. Enfin, certaines études laissent à penser qu'il pourrait y avoir des effets à distance à l'âge adulte après une exposition néonatale ; il s'agit de l'effet DOHaD (origine développementale des maladies humaines adultes/ *Developmental origins of human adult diseases*), et même après plusieurs générations signifiant une modification transgénérationnelle de l'épigénôme. Ces pistes doivent être explorées pour confirmer ou infirmer ces résultats.
- Par ailleurs, l'exposition ubiquitaire, justifie la prise en compte de leurs effets liés à une exposition combinée à plusieurs de ces substances.

## Conclusions et perspectives

L'usage de certains composés de la famille des perfluorés et des phtalates est encadré du fait de l'application du règlement REACH et/ou de réglementations sectorielles. Certains autres composés de ces deux familles n'ont pour l'instant pas fait l'objet d'une évaluation dans un cadre réglementaire au niveau européen.

Le recensement des données disponibles sur certaines substances montre l'usage varié qui peut en être fait et qui conduit à une contamination de plusieurs compartiments de l'environnement, ainsi que d'aliments.

Ainsi, la question de la mesure de l'exposition de la population générale et professionnelle à certaines substances et des risques éventuels pour la santé se pose.

Les résultats des études ou expertise en cours à l'Anses, notamment portant sur les contaminations alimentaires (études EATi, Contreperf), ou d'études de biosurveillance conduites par ailleurs en France vont conduire l'agence à évaluer la contribution de différents milieux à l'exposition interne et à évaluer les risques pour la santé humaine par une approche agrégée prenant en compte l'ensemble des voies d'exposition.

Les composés perfluorés concernés incluent, PFOS et PFOA, et pour ce qui concerne les phtalates, DEHP, BBP, DIDP. Il s'agira en particulier de comparer les niveaux d'exposition observés à des valeurs de référence lorsqu'elles existent.

Certaines substances ne disposent actuellement pas de valeurs toxicologiques de référence (VTR) alors que leur toxicité a été documentée. Aussi, l'Anses mandatera le CES « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » en vue de proposer des VTR prenant en compte leurs effets reprotoxiques et/ou PE. Les composés perfluorés concernés incluent, PFHxA, PFHxS, PFBA, PFBS et pour ce qui concerne les phtalates, DIBP, DnOP, DIOP.

Maisons-Alfort, le

Le Directeur général

**Marc MORTUREUX**

---

# **Connaissances relatives aux données de toxicité sur les composés de la famille des Phtalates**

---

**Saisine « n°2009-SA-0331 »**

**Tome 3**

**Version de mars 2015**

---

Mots clés

Phtalates, reprotoxicité, perturbation endocrinienne.

## Présentation des intervenants

**PREAMBULE** : Les experts externes, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

### **GRUPE DE TRAVAIL « PERTURBATEURS ENDOCRINIENS » (2014-2016)**

---

#### **Président**

M. Claude EMOND – Université de Montréal, Canada

#### **Vice-président**

M. Jean-Pierre CRAVEDI - Directeur de Recherche - INRA

#### **Membres**

M. Jean-Philippe ANTIGNAC - Ingénieur analyste - ONIRIS, LABERCA

Mme Martine APPLANAT-Directeur de recherche – INSERM.

M. Brice APPENZELLER - Responsable de laboratoire de biomonitoring - Centre de Recherche Public en Santé, Luxembourg

M. Rémy BEAUDOUIN-Chargé de recherche - INERIS.

M. Luc BELZUNCES – Directeur de recherche – Laboratoire de Toxicologie Environnementale, UR 406 A&E, INRA

Mme Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER-Chargé de recherche-INRA.

M. Nicolas CHEVALIER-Médecin endocrinologue-Praticien hospitalier- CHU de Nice.

Mme Cecile CHEVRIER –Chargé de recherche-INSERM.

Mme Martine CLAUW - Toxicologue-vétérinaire - INPT/ENVT, Université de Toulouse

Mme Elisabeth ELEFANT - Médecin spécialisé en tératologie humaine - Centre de référence sur les Agents tératogènes - AP-HP hôpital Armand Trousseau, Paris

Mme Florence EUSTACHE - Médecin - CECOS, AP-HP, Hôpital Jean Verdier, Paris

M. René HABERT - Professeur des universités - Université Paris Diderot

Mme Brigitte LE MAGUERESSE-BATTISTONI - Directeur de Recherche – INSERM

Mme Sakina MHAOUTY- KODJA - Directeur de recherche – CNRS.

M. Christophe MINIER - Ecotoxicologue - Université du Havre

M. Luc MULTIGNER - Médecin épidémiologiste – INSERM

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur à l'URAFPA, INRA USC 340.

M. Patrick THONNEAU - Médecin - INSERM

Mme Catherine VIGUIE – Vétérinaire – Directrice de Recherche INRA

---

## Comité d'experts spécialisé

- CES « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence ».

### Président

M. Michel GUERBET – Professeur de toxicologie à l'UFR médecine pharmacie de Rouen - Pharmacien toxicologue

### Vice-président

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue, pilote de la thématique reproduction et travail à l'INRS – Médecine du travail, toxicologie, reprotoxicité

### Membres

M. Marc BARIL - Professeur associé à l'Université de Montréal – Chimiste toxicologue, VLEP

M. Sylvain BILLET – Enseignant chercheur / maître de conférence en toxicologie à l'Université du Littoral Côte d'Opale – Toxicologie respiratoire, nanomatériaux

Mme Michèle BISSON – Responsable d'étude à l'INERIS – Pharmacien toxicologue, toxicologie générale - VTR

Mme Anne CHEVALIER – Epidémiologiste retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire

M. François CLINARD – Epidémiologiste à l'Institut de Veille Sanitaire – Pharmacien toxicologue, épidémiologie, évaluation des risques sanitaires

Mme Fatiha EL-GHISSASSI – Scientifique, Section des Monographies de IARC (IMO) Centre International de Recherche sur le Cancer - Docteur es science en biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

Mme Mounia EL-YAMANI – Responsable d'unité à l'Institut de Veille sanitaire – Docteur es science en biochimie, toxicologie, VLEP

M. Claude EMOND – Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal – Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Guillaume GARCON – Professeur de toxicologie à l'Université de Lille 2 – Toxicologie générale, cancérologie, modèles expérimentaux, toxicologie respiratoire, pollution atmosphérique

M. Ludovic LE HEGARAT – Chef d'unité adjoint Toxicologie des contaminants - Anses – Laboratoire de Fougères- Toxicologie, génotoxicité, nanomatériaux

M. Karim MAGHNI – Professeur sous octroi agrégé à l'Université de Montréal – Toxicologie, immunologie, asthme, allergies, nanomatériaux

Mme Véronique MALARD – Ingénieur chercheur en toxicologie au Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives, Centre de Marcoule. – Toxicologie « *in vitro* », biologie cellulaire, nanotoxicologie, protéomique.

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue au Service de santé des armées

M. Jean-Paul PAYAN – Chef du laboratoire Pénétration Cutanée, Cinétique et Métabolisme à l'INRS, Nancy – Pharmacien toxicologue, toxicocinétique

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur à l'URAFPA, INRA USC 340, Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine - Pharmacien biologiste - Neurotoxicité, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

M. Alain SIMONNARD – Chef de département à l'INRS, Nancy - Pharmacien toxicologue, toxicologie générale et reprotoxicité, anatomopathologie

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève – Docteur es science en biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie



Mme Lydie SPARFEL – Professeur à l'Université de Rennes 1 / IRSET 'Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail' UMR INSERM 1085– Pharmacien Toxicologue, immunotoxicologie, toxicogénomique, cancérologie, biologie cellulaire et moléculaire

M. Jérôme THIREAU – Chargé de recherche au CNRS – Docteur es science, physiologie animale, biologie cellulaire, cardiotoxicité

GRUPE DE TRAVAIL « PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET REPROTOXIQUES DE CATEGORIE 3 » (2009-2013)

---

**Président**

M. Claude EMOND – Université de Montréal, Canada

**Vice-président**

M. Luc BELZUNCES – Directeur de Recherche - Laboratoire de Toxicologie Environnementale, UR 406 A&E, INRA

**Membres**

M. Jean-Philippe ANTIGNAC– Ingénieur analyste - ONIRIS, LABERCA

M. Brice APPENZELLER – Responsable de laboratoire de biomonitoring – Centre de Recherche Public en Santé – Luxembourg

M. Mohammed BENHAMED – Médecin – endocrinologue - toxicologue - INSERM

M. Nicolas BERTRAND – Ingénieur - NRS

M. Olivier BLANCHARD – Expologue - EHESP

Mme. Martine CLAUW – Toxicologue-vétérinaire - INPT/ENVT, Université de Toulouse

M. Jean-Pierre CRAVEDI– Directeur de Recherche - INRA

Mme. Elisabeth ELEFANT – Médecin spécialisé en tératologie humaine - Centre de référence sur les Agents tératogènes hôpital Trousseau APHP Paris

Mme. Florence EUSTACHE – Médecin - CECOS, Hôpital Jean Verdier, APHP

Mme. Véronique EZRATTY – EDF, Médecin de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif) et d'un service de prévention et de dépistage des tumeurs de la ville de Paris

Mme Joëlle FEVOTTE – Chercheur - UMRESTTE UCB Lyon 1

M. René HABERT – Professeur des universités- Université Paris Diderot

Mme. Brigitte LE MAGUERESSE-BATTISTONI – Directeur de Recherche- INSERM

M. Frédéric LEMARCHAND – Analyse sociologique - Université de Caen

Mme Laura MAXIM – Chargée de recherche - CNRS

Mme. Corinne MANDIN – Ingénieur expologue - CSTB

M. Christophe MINIER – Ecotoxicologue - Université du Havre

M. Luc MULTIGNER – Médecin épidémiologiste - INSERM

M. Alexandre PERY – Responsable d'unité – INERIS

M. Wilfried SANCHEZ – Ecotoxicologue - INERIS

Mme. Anne STEENHOUT – Exposition agrégée - Université libre de Bruxelles

Mme. Larissa TAKSER– Médecin épidémiologiste - Université de Sherbrooke, Canada

M. Patrick THONNEAU – Gynécologue-Obstétricien /Andrologue - Epidémiologiste - INSERM

Mme. Catherine VIGUIE – Vétérinaire - INRA

COMITE D'EXPERTS SPECIALISE

---

- CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques ».

**Président**

M. Michel GUERBET – Professeur de toxicologie à l'UFR médecine pharmacie de Rouen - Pharmacien toxicologue

**Vice-président**

Mme Béatrice SECRETAN-LAUBY – Docteur en toxicologie, Scientifique pour monographies du CIRC – groupe IMO, CIRC/ OMS

**Membres**

M. Luc BELZUNCES – Directeur de Recherche - Laboratoire de Toxicologie Environnementale, UR 406 A&E, INRA

M. Damien BOURGEOIS – Chargé de Recherche – Institut de Chimie Séparative de Marcoule - CNRS

Mme Corinne CASSIER-CHAUVAT – Directrice de Recherche DR2 CNRS – iBiTecS/SBIGeM/LBI, unité mixte CEA-CNRS URA 2096

Mme Anne CHEVALIER – épidémiologiste retraitée - InVS

M. Pascal EMPEREUR-BISSONNET - Médecin, responsable de l'unité « Populations, Risques, Territoires » - Département Santé Environnement, InVS

Mme Brigitte ENRIQUEZ – Enseignant chercheur (Pr) Pharmacie – toxicologie / Responsable de la pharmacie centrale – Unité de Pharmacie Toxicologie, ENVA

Mme Dominique GUENOT – Chargée de recherche - CNRS

M. Michel GUERBET – Professeur des Universités en toxicologie – Laboratoire de toxicologie, UFR Médecine Pharmacie de Rouen.

M. Cong Khanh HUYNH – Docteur es Sciences - Ingénieur chimiste – Institut universitaire Roman de Santé au Travail

M. Kannan KRISHNAN – Professeur, Enseignant chercheur - Santé publique et Toxicologie - Département de Santé environnementale et de santé au travail, Université de Montréal

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue, pilote de la thématique reproduction et travail– INRS

Mme Dominique LAGADIC-GOSSMANN – Directrice de Recherche CNRS – EA 4427 SeRAIC / IRSET, Université Rennes 1

Mme Annie LAUDET - Pharmacien toxicologue retraitée – INRS

Mme Florence MÉNÉTRIER – Responsable de l'unité Prositon / Pharmacien – DSV/Prositon, CEA

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail, toxicologue – Service de santé des armées

Mme Odette PRAT - Chercheur Biologiste Toxicologue / Responsable Toxicogénomique - Institut de Biologie Environnementale et de Biotechnologie / DSV/ CEA

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur / Pharmacien biologiste – URAFPA, INRA USC 340, Faculté des Sciences et Technologies, Nancy université

---

**PARTICIPATION ANSES**

---

**UEDRS :**

Geoffrey Argiles

Claire Beausoleil

Céline Dubois

Aurélie Mathieu-Huart

François Pouzaud

Christophe Rousselle

Lauranne Verines-Jouin

**UERA :**

Emmanuelle Durand

Carole Leroux

Valérie Pernelet-Joly

**UERCA :**

Gilles Rivière

Stéphane Leconte

**UERE :**

Thomas Cartier

Anne Novelli

Pascale Panetier

**UMERPC**

Sebastien Denys

Marion Hulin

Véronique Sirot

**DERA :**

Nawel Bemrah

**DER**

Jean-Nicolas Ormsby

**DPR**

Catherine Gourlay-France

**Laboratoire d'hydrologie de Nancy**

Xavier Dauchy

# SOMMAIRE

## Table des matières

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>8</b>
<b>Sigles et abréviations .....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>14</b>
<b>1 Contexte, objet et modalités d'élaboration de ce rapport intermédiaire.....</b>	<b>15</b>
1.1 Contexte .....	15
1.2 Objet de ce rapport.....	16
1.3 Modalités de traitement.....	17
Moyens mis en œuvre et organisation .....	17
Méthodologie .....	17
<b>2 Données disponibles sur la toxicité des phtalates .....</b>	<b>19</b>
2.1 Valeurs de référence existantes .....	19
DEHP.....	19
Di-n-butyl phtalate (DnBP).....	21
ButylbenzylPhtalate (BBP).....	23
2.2 Evaluations européennes ou internationales : .....	25
<b>3 Données postérieures au rapport d'expertise de l'INSERM (2011) .....</b>	<b>26</b>
3.1 Données de biomonitoring .....	26
Recherche bibliographique (2010-2013) .....	26
Nomenclature, dénomination chimique et métabolites identifiés (cf. Tableau 8).....	30
Description des populations françaises étudiées .....	34
Méthodes analytiques.....	34
3.2 Données de toxicocinétique .....	38
Contenu de la littérature concernant la pharmacocinétique des phtalates .....	39
3.3 Effets sur le système reproducteur mâle.....	47
3.4 Données récentes chez l'animal postérieures à l'expertise Inserm : Effet d'une exposition fœtale et/ou néonatale sur le développement des fonctions de reproduction masculine.....	56
Données relatives au diisononyl phthalate (DINP) (Annexe 10).....	56
Données relatives au diisobutylphtalate (DIBP) .....	57
Données relatives au di-n-heptylphtalate (DHPP) et au di-n-octylphtalate (DnOP) .....	57
3.5 Effets sur le système reproducteur femelle.....	85
Données humaines.....	88
3.6 Autres effets.....	103
Effets sur la fonction thyroïdienne .....	103
Autres effets – Métabolisme - Obésité .....	107

---

Autres effets – PPAR.....	110
Autres effets – cancer du sein :.....	110
<b>4 Discussion – Perspectives .....</b>	<b>112</b>
<b>5 Bibliographie.....</b>	<b>115</b>

## Sigles et abréviations

AFSSAPS :	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AFSSA :	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AFSSET :	Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
ANSES :	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANOVA :	Analyse de variances
AR:	Récepteur aux androgènes (Androgen Receptor)
AUC :	Aire sous la courbe
BPL :	Bonne pratiques de laboratoire
CAS :	Chemical abstract service
CCRIS :	Chemical carcinogenesis research information system
CE :	Commission Européenne
CE50 :	Concentration Efficace induisant 50% de l'effet maximal
CHL :	Poumons d'hamster chinois
CHO :	Ovaires d'hamster chinois
CI50 :	Concentration Inhibant 50% de l'effet maximal
CLP :	Classification, labelling and packaging of substances and mixtures
CRAM :	Caisse régionale d'assurance maladie
CSST :	Commission de la santé et de la sécurité au travail
CTD :	Comparative Toxicogenomics Database
CTICM :	Centre Technique Industriel de la Construction Métallique
CTIF :	Centre Technique des Industries de la Fonderie
CITN :	Centre Technique de la Teinture et du Nettoyage
DE50 :	Dose efficace induisant 50% de l'effet
DGS :	Direction Générale de la Santé
DHT :	Dihydrotestostérone
DJT :	Dose journalière tolérable
DL50 :	Dose létale 50%
DMSO :	Diméthyl sulfoxyde
DPHP :	Di-2-propylheptylphtalate (DPHP)
E2 :	17 $\beta$ -Estradiol
EAT :	Etude de l'Alimentation Totale
ECHA :	European chemical agency
EDEN :	Etude des déterminants pré et postnatal du développement de la santé de l'enfant
EE :	Ethinyl estradiol
EEF :	Estradiol Equivalency Factor = CE50 Estradiol / CE50 Molécule testée
EINECS :	European inventory of existing commercial chemical substances
ER :	Récepteur aux estrogènes
ER $\alpha$ :	Récepteur $\alpha$ aux oestrogènes (ou Estrogen Receptor $\alpha$ )
ER $\beta$ :	Récepteur $\beta$ aux oestrogènes (ou Estrogen Receptor $\beta$ )

ERRy :	Récepteur apparenté aux récepteurs aux oestrogènes (Estrogen Related Receptor)
ERS :	Evaluation des risques sanitaires
FDS :	Fiche de données de sécurité
FES :	Fluorescent non-steroid estrogen
FICG :	Fédération de l'imprimerie et de la communication graphique
FIPEC :	Fédération des industries des peintures, encres, couleurs, colles et adhésifs
FOPH :	Federal Office of Public Health
JO :	Journal officiel
GC-FID :	Chromatographie gazeuse avec détection par ionisation de flamme
GerES :	German Environmental Survey
GH :	Growing hormone
GT :	Groupe de travail
HPV :	High Production Volume
HDL :	High Density Lipoprotein
HFD :	High Fat Diet
HGPRT :	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
HSDB :	Hazardous Substances Data Bank
IARC:	Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (International Agency for Research on Cancer)
Ineris :	Institut national de l'environnement industriel et des risques
Insee :	Institut national de la statistique et des études économiques
InVS :	Institut de Veille Sanitaire
INPES :	Institut national de prévention et d'éducation pour la santé
INRS :	Institut national de recherche et sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles
Inserm :	Institut national de la santé et de la recherche médicale
INFy :	Interféron gamma
IPCS :	International Programme on Chemical Safety
IV :	Intra-veineuse
INCA2 :	Etude individuelle nationale des consommations alimentaires 2
LABERCA	Laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments
Kd :	Constante de dissociation = concentration du ligand occupant 50 % des récepteurs
Koc :	Coefficient d'adsorption du sol
Kow :	Coefficient de partage octanol-eau
LD :	Limite de détection
LDL :	Low Density Lipoprotein
LIE :	Limite Inférieure d'Explosivité
NTP :	National Toxicology Program
LOAEL:	Lowest observed adverse effect level
LSE :	Limite Supérieure d'Explosivité
MEC :	Méthyléthylcétone

MEDDTL :	Ministère de l'Ecologie, du Développement durable, des Transports et du Logement
NAF :	Nomenclature d'activités françaises
LQ :	Limite de quantification
NTP :	National Toxicology Program
OCDE :	Organisation pour la Coopération et de Développement Economique
OECSEH :	Office of Environmental Chemicals Safety Environmental Health Bureau
OMS :	Organisation mondiale de la santé
OQAI :	Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur
PE :	Perturbateur endocrinien
PgR :	Récepteur à la progestérone
PND :	Post natal day
po :	Per os (voie orale)
PPAR $\gamma$ :	peroxisome proliferator-activated receptors gamma
ppm :	partie par million
RBA :	Relative Binding Affinity = (CE50 Estradiol / CE50 Molécule testée)*100
REACH :	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RfD :	Dose de référence
RPP :	Relative Proliferative Potency = (Dose d'estradiol nécessaire pour produire une prolifération maximale / Dose de molécule testée nécessaire pour produire une prolifération maximale)*100
SA :	Substance active
SCF :	Scientific Committee on Food
SCL :	Service Commun des Laboratoires
SFAE :	Syndicat Français des Aliments de l'Enfance
SGH :	Système global harmonisé
SNCP :	Syndicat national du caoutchouc et des polymères
T3 :	Triiodothyronine
T4 :	Thyroxine
TDI :	Tolerable Daily Intake (Dose journalière tolérable)
TNF $\alpha$ :	Tumor necrosis factor $\alpha$
U.S EPA :	United States Environmental Protection Agency
UBA :	UmweltBundesAmt (The Germany Federal Environment Agency)
UE :	Union européenne
UFIP :	Union française des industries pétrolières
UNIFA :	Union nationale des industries françaises de l'ameublement
VGAI :	Valeur Guide de qualité d'Air Intérieur
VLEP :	Valeur Limite d'Exposition Professionnelle
Vtg :	Vitellogénine
VTR :	Valeur Toxicologique de Référence



## Liste des tableaux

Tableau 1: VTR chronique de l'ANSES pour la voie orale pour les effets sur la reproduction du DEHP .....	19
Tableau 2 : Recensement des VTRs orales à seuil pour des expositions chroniques au DEHP .....	20
Tableau 3: VTR spécifique aux effets sur le développement pendant la gestation, pour une exposition subchronique au DnBP (ANSES).....	21
Tableau 4: Tableau récapitulatif de la recherche bibliographique conduite sur la période 2010-2013.	27
Tableau 5: Analyse préliminaire des données bibliographiques utilisant les mots clefs "phthalate*" + "biomonitoring" dans le titre (2010-2013). .....	28
Tableau 6 : Tableau récapitulatif du nombre de publication identifiées sur la période 2010-2013. ....	28
Tableau 7 : Analyse préliminaire des données bibliographiques utilisant les mots clefs "phthalate*" + "blood" dans le titre dans le titre (2010-2013). .....	29
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des molécules parentes et des métabolites identifiés chez l'Homme. ....	31
Tableau 9: Présentation des cohortes françaises dans lesquelles l'exposition aux phtalates a été évaluée .....	34
Tableau 10 : Métabolites de phtalates urinaires recherchés dans les cohortes EDEN, PELAGIE et ELFE, avec phtalates parents correspondants et performances des techniques analytiques utilisées. ....	36
Tableau 11: Concentrations urinaires en métabolites de phtalates rapportées dans différentes études. ....	37
Tableau 12: Principaux métabolites urinaires de phase I du DiNP chez des rates exposées par gavage (300 mg/kg pc) à deux préparations commerciales de DiNP (CAS 68515-48-0 et CAS 28553-12-0). Les structures indiquées correspondant à un seul des isomères potentiels. Les métabolites sont classés par ordre décroissant d'abondance dans l'urine. (d'après Silva <i>et al.</i> , 2006). ....	43
Tableau 13 :Tableau récapitulatif des études épidémiologiques analysées (reproduction masculine)	50
Tableau 14: Tableau récapitulatif des données expérimentales sur le système reproducteur mâle. ...	63
Tableau 15: Tableau récapitulatif des données expérimentales sur le système reproducteur mâle ....	68
Tableau 16 : Tableau récapitulatif des études épidémiologiques analysées (reproduction féminine-puberté féminine).....	95
Tableau 17 : Tableau récapitulatif des études épidémiologiques analysées (reproduction féminine- endométriose).....	98
Tableau 18 Tableau récapitulatif des études épidémiologiques analysées (reproduction féminine-fausses-couches spontanées).....	100
Tableau 19: phtalates inclus dans l'analyse, bilan des publications disponible de 2011 à 2013 et de publications antérieures non référencées dans le rapport INSERM. ....	102
Tableau 20: Récapitulatif des études expérimentales chez l'animal sur les effets reprotoxiques du DBP .....	141
Tableau 21: Récapitulatif des études animales sur la toxicité du DBP au cours du développement (NOAEL/LOAEL en mg/kg/jour) .....	147

## Liste des figures

Figure 1 : Structure générale des phtalates (R1 et R2 sont les mêmes groupes aryles ou alkyles) ....	16
Figure 2: Concentrations urinaires en métabolites de phtalates retrouvés chez les volontaires inclus dans les cohortes françaises EDEN, PELAGIE et ELFE. ....	36
Figure 3: Principales voies métaboliques de phase I des phtalates chez les rongeurs et chez l'Homme (d'après l'expertise collective de l'INSERM "reproduction et environnement", 2011). <i>Les systèmes enzymatiques impliqués figurent en italiques</i> . ....	42

# 1 Contexte, objet et modalités d'élaboration de ce rapport intermédiaire

## 1.1 Contexte

Ce rapport s'inscrit dans le travail en cours au sein de l'Anses sur la problématique des perturbateurs endocriniens. En 2009, le ministère chargé de la santé a saisi l'Afssaps, l'Afssa, l'Afset, l'InVS, l'INPES en vue d'une expertise sur la question des perturbateurs endocriniens rentrant dans leur champ de compétences respectifs. L'Inserm, pour sa part, a notamment été chargé de réaliser une expertise collective sur les effets de substances dites perturbateurs endocriniens en rassemblant et en analysant l'ensemble de la littérature scientifique disponible. Sur la base des substances identifiées *via* cette expertise comme préoccupantes pour leur toxicité sur la reproduction et/ou leur action de perturbateurs endocriniens, l'Agence a été saisie, avec pour mission :

- de hiérarchiser les substances à étudier en priorité,
- d'identifier les produits et articles contenant des substances reprotoxiques ou susceptibles de l'être (perturbateurs endocriniens notamment),
- d'analyser et, si possible, de quantifier les voies d'exposition de la population générale à ces substances. Une analyse spécifique sera réalisée concernant les populations vulnérables et les personnes exposées à ces substances dans un cadre professionnel, à travers l'utilisation de produits destinés au grand public,
- de procéder à une évaluation des risques et des bénéfices (les bénéfices sanitaires attendus pour certains produits).

L'un des objectifs de ce travail est, *in fine*, d'identifier les substitutions possibles pour les produits ou substances pour lesquels un risque sanitaire aurait été mis en évidence en s'assurant que les candidats à la substitution identifiés aient pu faire l'objet d'une évaluation des risques préalable à leur autorisation.

Dans le cadre de la saisine de la DGS « 2009-SA-0331 », l'Anses avait pour objectif d'évaluer les risques des composés listés en Annexe III et notamment pour les phtalates suivants :

Dénomination chimique	Acronyme	N° CAS
Butylbenzylphtalate	BBP	85-68-7
Di-(2-ethylhexyl) phtalate	DEHP	117-81-7
Diisodecyl phtalate	DIDP	26761-40-0 68515-49-1
Di-n-butyl phtalate	DBP	84-74-2
diisononyl phtalate = 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisononyl ester	DINP	28553-12-0 68515-48-0
Di-n-pentylphtalate	DnPP	131-18-0
Mono-n-butylphtalate		131-70-4
Dipropylphtalate		131-16-8
Diisobutyl phtalate	DIBP	84-69-5

Dénomination chimique	Acronyme	N° CAS
di-n-hexyl phtalate		84-75-3
Di-propyl-heptylphtalate	DPHP	53306-54-0

Suite aux auditions de représentants de l'industrie de la plasturgie et de chercheurs spécialisés dans le domaine de la toxicologie de la reproduction, les composés suivants sont apparus comme des composés à soumettre à expertise soit d'un point de vue toxicologique soit sur le versant de leurs usages. L'ANSES par conséquent, de les ajouter à la liste des phtalates à évaluer :

Dénomination chimique	Acronyme	N° CAS
Di-2propyl-heptylphtalate	DPHP	
Diisoundecylphtalate	DIUP	
Dicyclohexylphtalate	DCHP	
Diisooctylphtalate	DIOP	
Ditridecylphtalate	DTDP	

Les phtalates constituent un ensemble de molécules qui sont des diesters de l'acide ortho-phtalique. Plus précisément, il s'agit de di-alkyls esters ou alkyls aryls esters de l'acide 1,2-benzènedicarboxylique (esters de l'acide ortho-phtalique). Dans ce rapport, les iso- et téréphtalates (groupes esters attachés en positions méta et para sur le cycle benzénique) ne sont pas considérés. La Figure 1 présente la structure générale des phtalates.

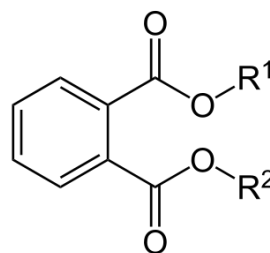


Figure 1 : Structure générale des phtalates (R1 et R2 sont les mêmes groupes aryles ou alkyles)

## 1.2 Objet de ce rapport

Par courrier du 4 juin 2009, la direction générale de la santé (DGS) a saisi l'Agence en vue de demander une expertise sur les risques sanitaires pour le consommateur liés à des substances reprotoxiques et/ou PE présents dans des produits et/ou articles mis sur le marché, dont certains phtalates (cf liste ci-dessus).

D'autres phtalates peuvent être présents dans des articles ou produits de consommation et potentiellement rencontrés dans différents compartiments de l'environnement. Ces composés ne faisaient pas l'objet de la saisine de la DGS. Néanmoins, dans le cadre de ce rapport intermédiaire, tous les éléments utiles à une meilleure connaissance des expositions

en lien avec les phtalates et à une meilleure compréhension des effets sanitaires de cette famille de composés seront considérés.

L'objet de ce rapport intermédiaire est de recenser les données disponibles ou en cours d'acquisition concernant les dangers potentiels d'un certain nombre de composés de la famille des phtalates ainsi que des données d'usage et de contamination de différents produits ou compartiments de l'environnement, incluant les eaux et l'alimentation. L'objectif final de ce rapport est de définir les principaux effets toxiques en lien avec une exposition à ces composés et de déterminer les sources principales d'exposition humaine, en vue de prioriser les phtalate qui pourront faire l'objet, dans un second temps, d'une évaluation des risques sanitaires (ERS).

### 1.3 Modalités de traitement

#### Moyens mis en œuvre et organisation

Ce rapport intermédiaire a été rédigé par l'Anses sur la base de documents disponibles en interne à l'Agence ou publiés par d'autres organismes d'expertise. Les données figurant dans ces documents n'ont pas fait l'objet d'une évaluation spécifique pour ce rapport intermédiaire. Elles ont été insérées dans ce rapport à partir du moment où elles peuvent apporter des éléments intéressants concernant les dangers et les expositions associés aux phtalates.

L'Anses a soumis ce rapport pour commentaires au Groupe de travail sur les « Perturbateurs endocriniens et reprotoxiques de catégorie 3 » ainsi qu'au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Évaluation des risques liés aux substances chimiques » en charge de l'instruction de la saisine de la DGS sur les perturbateurs endocriniens. Il a ainsi été discuté lors des réunions du GT « perturbateurs endocriniens » et de la réunion du CES « substances ». La version actuelle de ce rapport intermédiaire tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du GT.

#### Méthodologie

Afin d'évaluer la toxicité de chacune de ces substances, notamment sur la fonction de reproduction et la fonction endocrine, l'Anses a conduit une recherche bibliographique.

Les bases de données suivantes ont été consultées : PubMed, PubChem, Scopus, European Chemicals Bureau: EURAR /ESIS, ECHA - European Chemicals Agency, EFSA, TOXNET, ChemIDplus, Toxline, HSDB – Hazardous Substances Data Bank, CCRIS - Chemical Carcinogenesis Information, CTD - [Comparative Toxicogenomics Database](http://www.comparative-toxicogenomics-database.org/), Haz-Map, Genetox, GESTIS, CSST, INCHEM : <http://www.inchem.org/index.html>, Fiches du CSST (français) : [www.reptox.csst.qc.ca/](http://www.reptox.csst.qc.ca/), OCDE-SIDS initial assessment profile : <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/sidspub.html> et <http://webnet3.oecd.org/echemportal/et/>, IARC, NTP, CDC Chemical Emergency Response and ATSDR - Agency for toxic substances and diseases registry., CDC - Chemical Emergency Response, Immediately Dangerous to Life or Health Concentrations (IDLH) and Criteria documents, CCHST - Canadian Center for Occupational Health and Safety <http://ccinfoweb.cchst.ca/> (French), INRS - Institut national de recherche et de sécurité. Fiches toxicologiques, Toxicity Profiles of the American Risk Assessment Information System (RAIS) - Programme d'évaluation des substances d'intérêt prioritaire de Santé Canada : <http://risk.lsd.ornl.gov/>, EPA - Integrated Risk Information System (IRIS) Toxicological reviews, ATSDR - Agency for toxic substances and diseases registry. Toxicological Profiles, OEHHA, Santé Canada, OMS, INERIS, NIOSH, OSHA, SIDS, CIS –

Recherche Centre International de Sécurité et de Santé au Travail (CIS) Bases de données bibliographiques et Encyclopédie de Sécurité et de Santé au travail.

Les articles répertoriés ont été répartis de la manière suivante :

- articles rapportant les résultats d'études épidémiologiques ou des études de cas chez l'homme : « données humaines »
- articles rapportant les résultats d'études expérimentales réalisées sur l'animal de laboratoire et apportant des informations sur les effets potentiels de la substance sur la fonction de reproduction et la fonction endocrine en lien avec la sphère de la reproduction (par exemple, études de reprotoxicité, de toxicité chronique ou subchronique, de cancérogenèse) : « étude *in vivo* ».
- articles rapportant les résultats d'études *in vitro* (modèles cellulaires...) ou *in silico* (QSAR...) susceptibles d'apporter des informations sur le mécanisme d'action de la substance en lien avec les effets potentiels de la substance sur la fonction de reproduction et la fonction endocrine en lien avec la sphère de la reproduction: « étude *in vitro* ».

En ce qui concerne la partie identification des produits et/ou articles contenant ces substances ainsi que la partie évaluation de l'exposition, la méthodologie employée est détaillée comme suit :

- réalisation d'une enquête de filières auprès des industriels français identifiés comme potentiellement concernés par les substances grâce aux recherches bibliographiques ;
- interrogation de bases de données afin de compléter les informations obtenues par les industriels ;
- réalisation d'une recherche bibliographique pour l'identification des données d'exposition relatives aux environnements domestiques et/ou extérieurs ;
- afin de disposer de données françaises de concentration en composés organiques semi-volatils (COSV) dans les environnements intérieurs (air intérieur et poussières sédimentées), l'Anses a commandité une étude spécifique visant à documenter les concentrations de 35 composés.
- Alimentation : Consultation des réglementations relatives aux matériaux destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.
- Eau pour la partie relative à la contamination par les phtalates des eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) (distribution publique ou eaux conditionnées) : Recherche bibliographique et exploitation des base de données menées par l'Unité d'évaluation des risques liés à l'eau et par le laboratoire d'hydrologie de Nancy de l'Anses, consultation du groupe de travail (GT) de l'Anses « Évaluation de l'innocuité sanitaire des matériaux et objets utilisés dans les installations fixes de production, de traitement et de distribution d'eau destinée à la consommation humaine (MCDE) » pour le paragraphe relatif aux matériaux au contact de l'EDCH et validation de l'avis par le CES « Eaux » (mars 2014) – Avis dans le tome 2, annexe 4.

Enfin, suite à l'analyse des données de toxicité et d'exposition disponibles ou en cours d'acquisition, l'Agence se positionnera sur la pertinence et sur la faisabilité d'une évaluation de risques sanitaires pour certains de ces composés.

## 2 Données disponibles sur la toxicité des phtalates

### 2.1 Valeurs de référence existantes

Ce chapitre présente, d'une part, les Valeurs de référence (VTR, VGAI, VLEP) proposées par l'Anses pour certains phtalates et, d'autre part, les VTR proposées par les principaux organismes et institutions reconnus au niveau national ou supranational disponibles dans les bases de données toxicologiques. L'ensemble de ces données sont récapitulées dans le tableau 23 du tome 2.

### DEHP

#### Valeurs de référence ANSES

- Valeur toxicologique de référence (VTR)

Le CES Chimie a retenu en 2012 la VTR proposée par l'EFSA en se fondant sur des critères d'explicitation de la démarche mais aussi sur la qualité de l'étude clé, le choix de l'effet, de la dose critique et des facteurs d'incertitude.

La VTR chronique pour la voie orale pour les effets sur la reproduction du DEHP proposée à l'issue de l'expertise est reportée dans le Tableau 1: VTR chronique de l'ANSES pour la voie orale pour les effets sur la reproduction du DEHP ci-dessous.

**Tableau 1: VTR chronique de l'ANSES pour la voie orale pour les effets sur la reproduction du DEHP**

phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP) n°CAS : 117-81-7			
Effet critique	Dose critique*	UF	VTR
Anomalies développementales des organes reproducteurs mâles Etude multi générationnelle Wolfe and Layton (2003)	LOAEL = 14 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> NOAEL = 5 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	100  UF <sub>A</sub> 10 UF <sub>H</sub> 10	0,05 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

Sur la base des études de reprotoxicité réalisées sur l'animal, le CES a conclu que les enfants prépubères et les femmes enceintes sont plus sensibles aux effets reprotoxiques du DEHP.

L'exposition de la population au DEHP étant permanente au cours de la vie, la VTR s'applique pour une exposition des adultes (incluant les femmes enceintes) et des enfants.

Etant donné l'absence de connaissance précise sur le mécanisme d'action et la période critique de sensibilité, le CES préconise que la valeur calculée pour une exposition long terme et basée sur des effets reprotoxiques, soit également respectée pour les expositions de courte durée.

L'avis de l'Agence est consultable sur le site internet *via* le lien suivant :

<http://www.anses.fr/Documents/CHIM2012sa0180.pdf>

- Valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP)

Le CES VLEP a recommandé en 2011 de fixer **une valeur limite d'exposition professionnelle-8h** pour le DEHP de **0,8mg/m<sup>3</sup>**

Cette recommandation a pour objectif de prévenir sur les lieux de travail d'éventuels effets reprotoxiques (aspermato-génèse).

Cette valeur résulte de l'identification *via* l'étude de David et al (2000) d'un NOAEL estimé pour la voie inhalatoire à 7,6 mg/m<sup>3</sup> auquel un facteur de sécurité de 9 a été appliqué afin de tenir compte de la susceptibilité interindividuelle et du fait que cette valeur a été calculée à partir d'une étude par voie orale. L'étude de David a été retenue comme la plus pertinente pour dériver une VLEP car il s'agit d'une étude à long terme (sur deux ans) menée sur une population de rats adultes avec une exposition chronique au sein de laquelle un effet critique transposable au travailleur a pu être identifié.

Il est à noter que la valeur estimée du NOAEL inhalatoire à partir de cette étude par voie orale est cohérente avec les autres valeurs identifiées par d'autres études menées par voie inhalatoire mais jugées de moins bonne qualité.

L'avis de l'Agence ainsi que le rapport d'expertise sont consultables sur le site internet *via* le lien suivant : <http://www.anses.fr/Documents/VLEP2007sa0420.pdf>

- Valeur Guide de qualité d'Air Intérieur (VGAI)

Une VGAI est en cours de construction par l'Anses.

### **Autres valeurs toxicologiques de référence**

Le Tableau 2 recense les différentes VTR orales à seuil pour des expositions chroniques au DEHP.

**Tableau 2 : Recensement des VTRs orales à seuil pour des expositions chroniques au DEHP**

Organisme	Effet critique (espèce animale)	Dose critique (BMD/ NOAEL/ LOAEL)	UF	VTR (mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	Etude source
ATSDR (2002)	Aspermatogenèse (rats F344)	NOAEL = 5,8 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> Par l'alimentation 104 semaines	100	MRLc = 0,06	David <i>et al.</i> , 2000
Santé Canada (1994)	Toxicité du développement (souris)	NOAEL = 44 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> Par l'alimentation	1000	TDI = 0,044	Wolkowski-Tyl <i>et al.</i> , 1984
RIVM (2000)	Vacuolisation des cellules de Sertoli (rats SD)	NOAEL = 3,7 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> Par l'alimentation 13 semaines	1000	TDI = 0,004	Poon <i>et al.</i> , 1997



Organisme	Effet critique (espèce animale)	Dose critique (BMD/ NOAEL/ LOAEL)	UF	VTR (mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	Etude source
US EPA (1987)	Augmentation du poids du foie (cochons d'Inde)	LOAEL = 19 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> Par l'alimentation 1 an	1000	RfD = 0,02	Carpenter <i>et al.</i> , 1953
EFSA (2005)	Toxicité testiculaire et toxicité du développement (rats SD)	NOAEL = 5 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> Par l'alimentation 3 générations	100	TDI = 0,05	Wolfe and Layton, 2003

## Di-n-butyl phtalate (DnBP)

### Valeurs de référence ANSES

- Valeur toxicologique de référence (VTR)

Le CES Chimie a proposé en 2008 la construction d'une VTR spécifique aux effets sur le développement pendant la gestation, pour une exposition subchronique au DnBP (cf. Tableau 3: VTR spécifique aux effets sur le développement pendant la gestation, pour une exposition subchronique au DnBP (ANSES)).

**Tableau 3: VTR spécifique aux effets sur le développement pendant la gestation, pour une exposition subchronique au DnBP (ANSES)**

<b>-- Di-n-butyl phtalate (DnBP) 84-74-2 --</b>			
<b>Effet critique</b>	<b>Dose critique*</b>	<b>UF</b>	<b>VTR</b>
Diminution spermatocytaire et dysplasies mamelonnaires observés dans la descendance  Etude de toxicité prénatale orale chez le rat Sprague-Dawley (GD15-PND21)  Lee <i>et al.</i> 2004	<b>LOAEL = 2 mg/kg/j</b>  Absence de NOAEL BMDL peu pertinente	<b>1000</b>  UF <sub>A</sub> 10 UF <sub>H</sub> 10 UF <sub>L</sub> 10	<b>VTR = 0,002 mg/kg/j</b>  <b>Niveau de confiance</b> Recueil de données : fort Etude : moyen (incertitude +) Dose critique : moyen (absence de NOAEL) VTR : moyen

\*Facteurs de conversion temporels, coefficients allométriques : NEANT. Le CES n'a pas souhaité appliquer d'ajustement allométrique à la dose critique car ce type d'ajustements n'a pas encore fait l'objet d'une étude approfondie en France, et le document de référence pour la construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques n'a pas encore abordé cette question. La nécessité d'approfondir la compréhension des transpositions animal – homme et du facteur d'incertitude UF<sub>A</sub> incite à recommander qu'une réflexion plus poussée soit faite en ce sens.

Le CES avait par ailleurs souhaité préciser que : « la VTR est construite sur la base des connaissances actuelles. Dans le cadre des phtalates, dont les plus connus ont une toxicité sur le développement liée à leur caractère perturbateur endocrinien, les niveaux de connaissances sont différents d'une substance individuelle à l'autre. Les études toxicologiques n'étant pas conduites selon les mêmes protocoles pour tous les phtalates, les LOAEL et les NOAEL issus de ces études ne peuvent être mis en regard et les VTR proposée ne peuvent être le reflet direct de la toxicité de ces substances. Ainsi, bien que le benzybutylphtalate (BBP) et le DnBP aient probablement une toxicité similaire, la VTR proposée pour le DnBP est plus faible que celle du BBP. »

L'avis de l'Agence ainsi que le rapport d'expertise sont consultables sur le site internet via le lien suivant : <http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/CHIM2003etAS03Ra-3.pdf>

- Valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP)

Une VLEP est en cours d'élaboration par le CES VLEP ; elle sera prochainement mise en consultation sur le site de l'Agence.

Le CES VLEP a recommandé de fixer **une valeur limite d'exposition professionnelle-8h** pour le DBP de **0,7 mg/m<sup>3</sup>**

Effet critique	Dose critique	FS	VLEP-8h
Diminution de la concentration de testostérone foétale Lehman <i>et al.</i> , 2004	<b>NOAEL = 10 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup></b> <u>Ajustement allométrique :</u> <b>NOAEL<sub>HEC vo</sub> = 2,44 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup></b>  <u>Extrapolation voie à voie</u> <b>NOAEL<sub>HEC inhalé</sub> = 6,42 mg. m<sup>-3</sup></b>	<b>9</b> FS <sub>A</sub> 3 FS <sub>H</sub> 3	<b>0,7 mg.m<sup>-3</sup></b>

- Valeur Guide de qualité d'Air Intérieur (VGAI)

Aucune VGAI n'a été proposée à ce jour par l'Anses pour le DnBP.

### Autres valeurs toxicologiques de référence

Le tableau suivant recense les différentes VTR orales à seuil pour des expositions chroniques au DnBP :

Organisme	Effet critique (espèce animale)	Dose critique (BMD/ NOAEL/ LOAEL)	UF	VTR (mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	Etude source
ATSDR (2002)	ND	ND	ND	ND	ND
Santé Canada (1994)	Toxicité du développement (souris)	NOAEL = 66.5 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> <sub>1</sub>	1000	TDI = 0,063	Hammano <i>et al.</i> , 1977

Organisme	Effet critique (espèce animale)	Dose critique (BMD/ NOAEL/ LOAEL)	UF	VTR (mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	Etude source
RIVM (2000)	Embryotoxicité (rats)	LOAEL = 52 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	1000	TDI = 0,052	Marsman, 1995 ; Wine <i>et al.</i> , 1997
US EPA (1987)	Mortalité (rat)	NOAEL = 125 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	1000	RfD = 0,01	Smith CC., 1953
EFSA (2005)	Toxicité testiculaire et toxicité du développement rats	LOAEL = 2 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> GD15-PND21	200	TDI = 0,01	Lee <i>et al.</i> , 2004

## ButylbenzylPhtalate (BBP)

### Valeurs de reference ANSES

- Valeur toxicologique de référence (VTR)

Le CES Chimie a proposé en 2008 la construction d'une VTR spécifique aux effets sur le développement du BBP. Compte tenu des effets sur le développement de l'appareil génital mis en évidence, qui signent une perturbation endocrinienne et dont la fenêtre d'exposition critique correspond à la période de gestation, la VTR sera applicable pour une exposition subchronique (pendant la durée de la gestation). Cette VTR protège également des effets tératogènes mis en évidence chez l'animal, pour lesquels des NOAEL étaient beaucoup plus élevés.

### -- Benzyl butyl phtalate (BBP) 85-68-7 --

Effet critique	Dose critique*	UF	VTR
Diminution de la distance anogénitale chez les descendants mâles Etude sur deux générations chez le rat Sprague Dawley exposé par gavage Tyl <i>et al.</i> 2004	<b>NOAEL = 50 mg/kg/j</b>  LOAEL = 250 mg/kg/j	<b>100</b>  UF <sub>A</sub> 10 UF <sub>H</sub> 10	<b>VTR = 0,5 mg/kg/j</b>  <b>Niveau de confiance</b> Recueil de données : fort Etude : fort Dose critique : fort VTR : fort

\*Coefficients allométriques : NEANT. Le CES n'a pas souhaité appliquer d'ajustement allométrique<sup>1</sup> à la dose critique car ce type d'ajustements n'a pas encore fait l'objet d'une étude approfondie en France, et le document de référence pour la construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques n'a pas encore abordé cette question. La nécessité d'approfondir la compréhension des transpositions animal – homme et du facteur d'incertitude  $UF_A$  incite à recommander qu'une réflexion plus poussée soit faite en ce sens.

- Valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP)

Une VLEP est en cours d'élaboration par le CES VLEP; elle sera prochainement mise en consultation sur le site de l'Agence.

Le CES VLEP a recommandé de fixer **une valeur limite d'exposition professionnelle-8h** pour le BBP de **4,8 mg/m<sup>3</sup>**

Effet critique	Dose critique	FS	VLEP-8h
Altération des organes reproducteurs et de la fertilité NTP, 1997	NOAEL = 200 mg/kg/j Ajustement allométrique NOAEL <sub>HECvo</sub> = 49 mg/kg/j <u>Extrapolation voie à voie</u> NOAEL <sub>HECinhalé</sub> = 128,7 mg.m <sup>-3</sup>	27 FS <sub>A</sub> 3 FS <sub>H</sub> 3 FS <sub>S</sub> 3	4,8 mg.m <sup>-3</sup> soit environ 5 mg.m <sup>-3</sup>

- Valeur Guide de qualité d'Air Intérieur (VGAI)

Aucune VGAI n'a été proposée à ce jour par l'Anses pour le BBP.

<sup>1</sup> Certains organismes proposent parfois des doses ou concentrations critiques « human equivalent » par l'application d'ajustements tenant compte des différences de surfaces corporelles lors d'une exposition orale ou d'autres paramètres physiologiques spécifiques à la voie respiratoire. Ces ajustements n'ont pas encore fait l'objet de discussions approfondies au sein des groupes de travail français.

### Autres valeurs toxicologiques de référence

Le tableau suivant recense les différentes VTR orales à seuil pour des expositions chroniques au BBP :

Organisme	Effet critique (espèce animale)	Dose critique (BMD/ NOAEL/ LOAEL)	UF	VTR (mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	Etude source
ATSDR (2002)	ND	ND	ND	ND	ND
Santé Canada (1998)	Toxicité du pancréas (rat)	BMD(05)L = 132 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	100	TDI = 1.3	Hammond <i>et al.</i> , 1987
RIVM (2000)	Toxicité systémique (rénale, lignée sanguine) et testiculaire (rats- souris)	NOAEL = 151 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	300	TDI = 0, 5	Hammond <i>et al.</i> , 1987
US EPA (1989)	Toxicité hépatique (rat)	NOAEL = 159 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	1000	RfD = 0,2	NTP, 1985
EFSA (2005)	Toxicité testiculaire rats SD	NOAEL = 50 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> Par l'alimentation 3 générations	100	TDI = 0,5	Tyl <i>et al.</i> , 2001, 2004

## 2.2 Evaluations européennes ou internationales :

Lorsque des évaluations européennes ou internationales (ex. évaluations de l'OCDE) ont été réalisées ; celles-ci ont été reportées dans le chapitre 2.6 du tome 2.

### **3 Données postérieures au rapport d'expertise de l'INSERM (2011)**

En juin 2011, l'INSERM a publié un rapport d'expertise collective intitulé « reproduction et Environnement » qui présente les travaux du groupe d'experts réunis par l'INSERM pour répondre à la demande du ministère de la santé concernant les substances chimiques accessibles au grand public et leurs effets sur la reproduction. Ce rapport comporte un chapitre dédié aux phtalates. Dans le cadre de ce travail, seules les études récentes postérieures à l'expertise de l'INSERM ont été recensées.

#### **3.1 Données de biomonitoring**

##### **Principales conclusions de l'expertise collective de l'INSERM de 2011 :**

Selon les composés, la demi-vie plasmatique chez l'Homme est de 8 à 48 heures. Elle est de 18 heures pour le DEHP. Si on n'observe pas de bioaccumulation, il est important de signaler que comme pour le BPA, l'exposition est continue du fait de la diversité des sources de contamination (alimentaire, environnement, cosmétiques...). Les études réalisées chez l'homme ou la femme montrent que certains phtalates ou leurs métabolites sont retrouvés dans les urines, le plasma sanguin, le plasma séminal, le lait maternel, le liquide amniotique et le sang du cordon.

#### **Recherche bibliographique (2010-2013)**

Une recherche bibliographique a été conduite afin d'inventorier les travaux de recherches publiés dont une étude détaillée serait nécessaire pour traiter de l'exposition interne aux phtalates dans le cadre du GT « perturbateurs endocriniens » (GT PE).

Les critères utilisés pour la recherche bibliographique réalisée sur deux bases de données différentes (ISI Web of Knowledge et PubMed) sont présentés dans le Tableau 4: Tableau récapitulatif de la recherche bibliographique conduite sur la période 2010-2013. Les mots clés sont recherchés dans le titre des articles. Bien que cette recherche ne soit focalisée que sur la période de 2010 à aujourd'hui, la recherche « non détaillée » a également été conduite sans limite de temps afin d'évaluer la quantité totale d'article potentiellement disponibles.

Tableau 4: Tableau récapitulatif de la recherche bibliographique conduite sur la période 2010-2013

Base de données interrogées		période	
ISI Web of Knowledge	Sans limite de temps	de 2010 à aujourd'hui	
Mots clés recherché dans le titre	commentaire	commentaire	
phthalate*	>7000	1238	
Phthalate* + exposure	503	196	
Phthalate* + biomonitoring	28	18	
Phthalate + urin*	217	98	
Phthalate* + blood	100	souvent "blood storage bag"	25
Phthalate* + cord blood	1	humain	0
Phthalate* + brain	12	aucune étude sur l'humain	3
Phthalate* + amniotic fluid*	5	dont 4 sur l'humain	2 dont 2 sur l'humain
Phthalate* + Daily exposure	2	1 seule accessible	0
<b>Pubmed</b>			
phthalate	2584	668	
phthalate* + exposure	355	139	
Phthalate* + biomonitoring	26	17	
phthalate* + urin*	162	82	
phthalate + blood	70	15	
phthalates + cord blood	1	idem que ISI	0
phthalates + brain	10	2 1 de moins que ISI WK	
Phthalate + amniotic fluid*	3	non répétabilité de la recherche	0
Phthalate* inclus "phthalate" et "phthalates"			
Urin* inclus "urine" et "urinary"			
fluid* inclus "fuid" et "fluids"			

La base de données choisie pour la suite de cette recherche est l'ISI Web of Knowledge en raison du nombre plus élevé de résultats obtenus ainsi que de la meilleure répétabilité dans le temps des résultats de recherche effectués.

Dans une première approche, les recherches conduites avec les mots clés "phthalate\*" et "phthalate\* + exposure" n'ont pas été reprises dans le détail car elles contiennent une grande majorité d'article non centrés sur les aspects de biomonitoring. Le détail des autres

recherches réalisées est présenté ci-dessous. Seuls les résultats concernant la période de 2010 à aujourd'hui ont été revus.

- **“phthalate\*” + “biomonitoring” dans le titre (2010-2013)**

Une analyse préliminaire (titre, abstract, lecture des figures et tableaux présents dans la publication si nécessaire) a été faite sur les 18 items rapportés par l'utilisation des mots clefs: “phthalate\* + biomonitoring”. Le résultat de cette analyse préliminaire, détaillée dans le Tableau 5: Analyse préliminaire des données bibliographiques utilisant les mots clefs “phthalate\*” + “biomonitoring” dans le titre (2010-2013), montre que 11 de ces 18 publications sont potentiellement pertinentes pour ce GT et nécessiteraient une analyse approfondie. Seules 2 publications semblent présenter un faible intérêt, 3 items correspondent en fait à des actes de congrès publiés (pas de données disponibles) et 1 publication est en langue allemande et non disponible avec les accès utilisés.

Tableau 5: Analyse préliminaire des données bibliographiques utilisant les mots clefs “phthalate\*” + “biomonitoring” dans le titre (2010-2013).

- **“phthalate\*” + “urin\*” dans le titre**

L'utilisation du critère d'exclusion “NOT biomonitoring” dans la section “titre” permet d'éliminer 8 doublons déjà identifiés plus haut. Cette nouvelle recherche apporte donc 90 items supplémentaires à la recherche précédente. Ces items (pertinents ou non pertinent pour le GT) peuvent être regroupés en plusieurs catégories présentées dans le Tableau 6 : Tableau récapitulatif du nombre de publication identifiées sur la période 2010-2013.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif du nombre de publication identifiées sur la période 2010-2013.

Catégories	Nombre de publications
<b>Publication a priori pertinente pour le GT</b>	
-Développement analytique (avec ou sans application à des échantillons réels)	12
-Comparaison des niveaux de concentration des métabolites urinaires avec d'autres paramètres biologiques (obésité, asthme, perte de poids, insulín résistance, hormones, pression artérielle, neurodéveloppement, issues de grosses, taille...)	43
-Niveaux d'exposition de populations (cohortes), associations avec sources d'exposition, comparaison mère / enfant, exposition in utero, etc	13
-Etudes de cinétiques urinaires (suivi dans le temps, comparaison des moments de prélèvement, etc)	10
Exposition professionnelle	
<b>Publications a priori non pertinentes pour le GT</b>	
-Travaux liés au domaine du dopage (métabolites urinaires utilisés comme -traceurs de transfusions sanguine illicite chez les sportifs)	6
-Etudes sur l'animal	2
-Erratum	2
-Doublons	1



## Conclusion :

79 des publications identifiées par cette recherche (centrée sur la période 2010-2013 uniquement) seraient susceptibles de contenir des informations pertinentes pour le GT et nécessiteraient donc une étude détaillée.

Les résultats de cette recherche confirment que la matrice urine est bien la plus utilisée dans le cadre du biomonitoring de l'exposition aux phthalates.

Remarques : Bien que les publications pertinentes soient classées en catégories différenciées, dans de nombreux cas, les publications pourraient en fait recouper plusieurs catégories. Par exemple, plusieurs travaux présentant l'étude des relations entre concentration urinaires et certains paramètres biologiques peuvent également être utilisés pour renseigner simplement les niveaux d'exposition des populations étudiées.

- **“phthalate\*” + “blood” dans le titre (cf. Tableau 7 : Analyse préliminaire des données bibliographiques utilisant les mots clefs “phthalate\*” + “blood” dans le titre dans le titre (2010-2013))**

Tableau 7 : Analyse préliminaire des données bibliographiques utilisant les mots clefs “phthalate\*” + “blood” dans le titre dans le titre (2010-2013).

Catégories	Nombre de publications	Dont doublons avec la recherche précédente
<b>Publication a priori pertinente pour le GT</b>		
Cinétiques sanguines	2	2
<b>Publications a priori non pertinentes pour le GT</b>		
-Résumés de congrès sans résultats disponibles	2	-
-Le sang n'est pas la matrice dans laquelle les dosages sont réalisés mais celle sur laquelle d'autres paramètres sont mesurés (e.g. Pression sanguine)	2	-
-Contamination du sang par les sacs plastiques contenant le sang ou par système de circulation extracorporelle	12	-
-Doublons	5	-

Cette recherche confirme que le sang ne semble pas être la matrice utilisée préférentiellement pour le biomonitoring de l'exposition humaine aux phthalates.

Les 2 publications jugées pertinentes avaient déjà été identifiées lors de la recherche précédente (Phthalate\* + urine\*).

- **“phthalate\*” + “amniotic” dans le titre**

1 publication et 1 résumé de congrès.

**Conclusions :**

Ce recensement de la bibliographie disponible concernant les données d'exposition interne aux phthalates sur la période 2010-2013 réalisée sur la base de données ISI Web of Knowledge fait apparaître l'existence de 83 publications dont l'étude détaillée serait pertinente dans le cadre des travaux du GT PE.

L'étude d'un certain nombre de publications antérieures à 2010 sera probablement nécessaire pour apporter les réponses à certaines questions ou pour consolider des conclusions basées sur les publications les plus récentes uniquement.

**Nomenclature, dénomination chimique et métabolites identifiés (cf. Tableau 8)**

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des molécules parentes et des métabolites identifiés chez l'Homme.

Parent	Target compounds for the biomonitoring					
	Name 1	Name 2	Abbreviation 1	Abbreviation 2	Abbreviation 3	
Dimethyl phthalate (DMP)	Mono-methyl-phthalate		MMP			
Diethyl phthalate (DEP)	Mono-ethyl-phthalate		MEP			
Di-cyclohexyl phthalate (DCHP)	Mono-cyclohexyl phthalate		MCHP			
Di-n-pentyl phthalate (DnPeP)	Mono-n-pentyl phthalate		MnPeP			
Butyl-benzyl-phthalate (BBzP)	Mono-benzyl-phthalate		MBzP			
	<a href="#">Mono-butyl-phthalate (probably minor metabolite)</a>		<a href="#">MBP or MnBP</a>			
Di-iso-butyl phthalate (DiBP)	Mono-iso-butyl phthalate		MiBP			
	3OH-mono-methylpropyl phthalate		OH-MiBP			
Di-n-butyl phthalate (DnBP or DBP)	<a href="#">Mono-n-butyl phthalate</a>		<a href="#">MBP or MnBP</a>			
	3OH-mono-n-butyl phthalate (OH-MnBP)		OH-MnBP			
	<a href="#">3carboxy-mono-propyl phthalate</a>		<a href="#">3cx-MiBP</a>	<a href="#">MCPP</a>		
Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	Mono(2-ethylhexyl) phthalate		MEHP			
	5OH-mono(2-ethylhexyl) phthalate		5OH-MEHP	MEHHP		
	5oxo-mono(2-ethylhexyl) phthalate		5oxo-MEHP	MEOHP		
	5carboxy-mono(2-ethylhexyl) phthalate		5cx-MEPP	MECPP		

	mono(2-carboxymethylhexyl)-phthalate		2cx-MMHP	MCMHP		
Di-n-octyl phthalate (DnOP)	Mono-n-octyl phthalate		MnOP			
	3cx-MnOP		3cx-MnOP			
	<u>3carboxy-mono-propyl phthalate</u>		<u>3cx-MiBP</u>	<u>M CPP</u>		
Di-iso-nonyl phthalate (DiNP) (! Several isomers)	Mono-iso-nonyl phthalate		MiNP			
	Mono(hydroxyisononyl)-Phthalate	7OH-Mono-methyloctyl phthalate	MHiNP	OH-MiNP		
	Mono-oxoisononyl phthalate	7oxo-mono-methyloctyl phthalate	MOiNP	oxo-MiNP		
	Mono-carboxyisooctyl-phthalate	7carboxy-mono-methylheptyl phthalate	MCiOP	cx-MiNP		
Di-iso-decyl phthalate (DiDP) (! Several isomers)	Mono-iso-decyl-phthalate		MiDP			
	Mono-hydroxyisodecyl-phthalate	6OH-mono-propylheptyl phthalate	MHiDP	OH-MiDP	OH-MPHP	
	Mono-oxoisodecyl-phthalate	6oxo-mono-propylheptyl phthalate	MOiDP	oxo-MiDP	oxo-MPHP	
	Mono-carboxyisononyl-phthalate	mono(2,7-methyl-7-carboxyheptyl)	MCiNP	cx-MiDP		

		phthalate				
Di-propylheptyl phthalate (DPHP)	Mono-propylheptyl phthalate		MPHP			
	Mono-hydroxypropylheptyl-phthalate		MHPHP	OH-MPHP		
	Mono-oxopropylheptyl-phthalate		MOPHP	oxo-MPHP		
	Mono-carboxypropylheptyl-phthalate		MCPHP	cx-MPHP		
Di(2-ethyl-hexyl)terephthalate (DEHT)						

Légende: les composés soulignés sont ceux susceptibles d'être obtenus à partir de plusieurs composés parents

## **Description des populations françaises étudiées**

Les données de biomonitoring relatives à l'exposition de la population française aux phtalates concernent 3 cohortes, PELAGIE, EDEN et ELFE, composées toutes de femmes enceintes, recrutées sur la période allant de 2002 à 2007 (Tableau 9: Présentation des cohortes françaises dans lesquelles l'exposition aux phtalates a été évaluée) et représentant un nombre total de 567 individus. Au total, 17 métabolites de phtalates correspondant à 9 composés parents ont été recherchés. La période de collecte des échantillons urinaires était différente pour chacune des cohortes. Les prélèvements étaient en effet réalisés en cours de grossesse pour les femmes intégrées aux cohortes PELAGIE (6 à 19 semaines de grossesse) et EDEN (24 à 30 semaines de grossesse) alors qu'ils étaient réalisés lors de l'accouchement dans le cadre de la cohorte ELFE. En plus du fait que les cohortes mises en jeu ne soient constituées que de femmes enceintes, un biais dans la sélection des sujets est lié au fait que pour les cohortes EDEN et PELAGIE, les échantillons ne proviennent que de mères dont l'enfant était de sexe masculin. De plus, dans ces cohortes, ¼ des échantillons provient de mères dont l'enfant présentait un problème de cryptorchidie ou d'hypospadias à la naissance. Ces cas représentaient n=48 dans la cohorte EDEN et n=24 dans la cohorte PELAGIE. Les autres sujets (servant de témoins) avaient été ajustés par rapport à ces cas, soit n=144 contrôles dans EDEN et n=72 contrôles dans PELAGIE.

Cohorte	Année du recrutement	Région	analytes recherchés	n	population	age	Période du prélèvement d'urine
PELAGIE	2003-2006	Ille et Vilaine, Finistère, Côtes d'Armor		192	femmes enceintes	29	6 - 19 sem gestation
EDEN	2002-2006	Nancy et Poitiers	MEP, MBP, MiBP, MBzP, MCP, MEHP, MEHHP, MEOHP, MECPP, MCOP, MCNP	96	femmes enceintes	29	24-30 sem gestation
ELFE	2007	Seine Denis et Rhones-Alpes	MiNP, MnOP, MCP, MCHP	140			à l'accouchement
			5cx-MEPP, 2cx-MMHP, oxo-MiNP, OH-MiNP, cx-MiNP, MBzP	139			
			MEP, 5OH-MEHP, 5oxo-MEHP, MEHP, MnBP, MiBP	279			

Tableau 9: Présentation des cohortes françaises dans lesquelles l'exposition aux phtalates a été évaluée

## **Méthodes analytiques**

Les méthodes analytiques utilisées pour l'analyse des métabolites de phtalates dans les prélèvements urinaires étaient dans tous les cas basées sur la chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) avec le plus souvent, une étape de purification des échantillons sur cartouches SPE (extraction phase solide).

Les valeurs sont quantifiées au-dessus d'une limite de détection dans le cas des cohortes EDEN et PELAGIE et au-dessus d'une limite de quantification dans le cas de la cohorte ELFE. Les autres paramètres de validations des méthodes analytiques employées ne sont pas présentés dans les études rapportant les concentrations urinaires mais sont parfois en partie disponibles dans des publications antérieures auxquelles les études se réfèrent. Cependant, ces paramètres sont souvent critiquables, principalement la variabilité, évaluée à des niveaux de concentrations supérieurs aux limites de détection/quantification annoncées (Koch *et al.*, 2007 ; Silva *et al.*, 2007).

Les performances des méthodes analytiques, en termes de sensibilité, semblent suffisantes pour la plupart des métabolites recherchés au vu des taux de détections positives rapportés dans chaque étude pour la plupart des métabolites (Tableau 10 : Métabolites de phtalates urinaires recherchés dans les cohortes EDEN, PELAGIE et ELFE, avec phtalates parents correspondants et performances des techniques analytiques utilisées.)

Composé parent	Métabolite recherché	Cohorte	LOD ou LOQ (µg/L)	% de valeurs au dessus de la limite	Référence
DEP	MEP	E	7,0	92	Zeman <i>et al.</i> , 2013
		P-E	0.5	100	Philippat <i>et al.</i> , 2012; Silva <i>et al.</i> , 2007
DEHP	MEHP	E	2,0	91	Zeman <i>et al.</i> , 2013
		P-E	1,2	92	Philippat <i>et al.</i> , 2012; Silva <i>et al.</i> , 2007
	5OH-MEHP	E	2	100	Zeman <i>et al.</i> , 2013
		P-E	0,7	100	Philippat <i>et al.</i> , 2012; Silva <i>et al.</i> , 2007
	5oxo-MEHP	E	2	100	Zeman <i>et al.</i> , 2013
		P-E	0,7	100	Philippat <i>et al.</i> , 2012; Silva <i>et al.</i> , 2007
	5cx-MEPP	E	1	100	Koch <i>et al.</i> , 2007
		P-E	0,6	100	Philippat <i>et al.</i> , 2012; Silva <i>et al.</i> , 2007
2cx-MMHP	E	1	100	Koch <i>et al.</i> , 2007	
DnBP	MnBP	E	2,0	100	Zeman <i>et al.</i> , 2013
		P-E	0,6	100	Philippat <i>et al.</i> , 2012; Silva <i>et al.</i> , 2007
DiBP	MiBP	E	2,0	99	Zeman <i>et al.</i> , 2013
		P-E	0,3	100	Philippat <i>et al.</i> , 2012; Silva <i>et al.</i> , 2007
DiNP	MiNP	E	4,0	0	Zeman <i>et al.</i> , 2013
	OH-MiNP	E	1,0	98	Zeman <i>et al.</i> , 2013
	oxo-MiNP	E	1,0	98	Zeman <i>et al.</i> , 2013
	cx-MiNP	E	1,0	100	Zeman <i>et al.</i> , 2013
DBzP	MBzP	E	1,0	98	Zeman <i>et al.</i> , 2013
		P-E	0,2	100	Philippat <i>et al.</i> , 2012; Silva <i>et al.</i> , 2007
DnOP	MnOP	E	4,0	0	Zeman <i>et al.</i> , 2013
	MCPP	E	4,0	24	Zeman <i>et al.</i> , 2013
		P-E	0,2	98	Philippat <i>et al.</i> , 2012; Silva <i>et al.</i> , 2007
DCHP	MCHP	E	2,0	3,6	Zeman <i>et al.</i> , 2013

DiDP

MCiNP

P-E

0,6

92

Philippat et al., 2012; Silva et al., 2007

E: ELFE; P-E: PLAGIE - EDEN;

Tableau 10 : Métabolites de phtalates urinaires recherchés dans les cohortes EDEN, PELAGIE et ELFE, avec phtalates parents correspondants et performances des techniques analytiques utilisées.

### Résultats des études françaises - Concentrations urinaires

Les concentrations urinaires en métabolites de phtalates analysés dans les cohortes françaises sont présentées sur la figure 1. Pour les métabolites communs aux deux études concernant respectivement la cohorte ELFE (Zeman et al., 2013) d'une part, et EDEN et PELAGIE d'autre part (Philippat et al., 2012), les concentrations rapportées (médianes et percentile 95) sont comparables pour certains composés mais peuvent varier significativement pour d'autres (Figure 2: Concentrations urinaires en métabolites de phtalates retrouvés chez les volontaires inclus dans les cohortes françaises EDEN, PELAGIE et ELFE). Seule l'étude de Zeman *et al.* présente les valeurs maximales observées pour chacun des métabolites recherchés, l'étude de Philippat *et al.* ne présentant que les percentiles (5, 50 et 95).

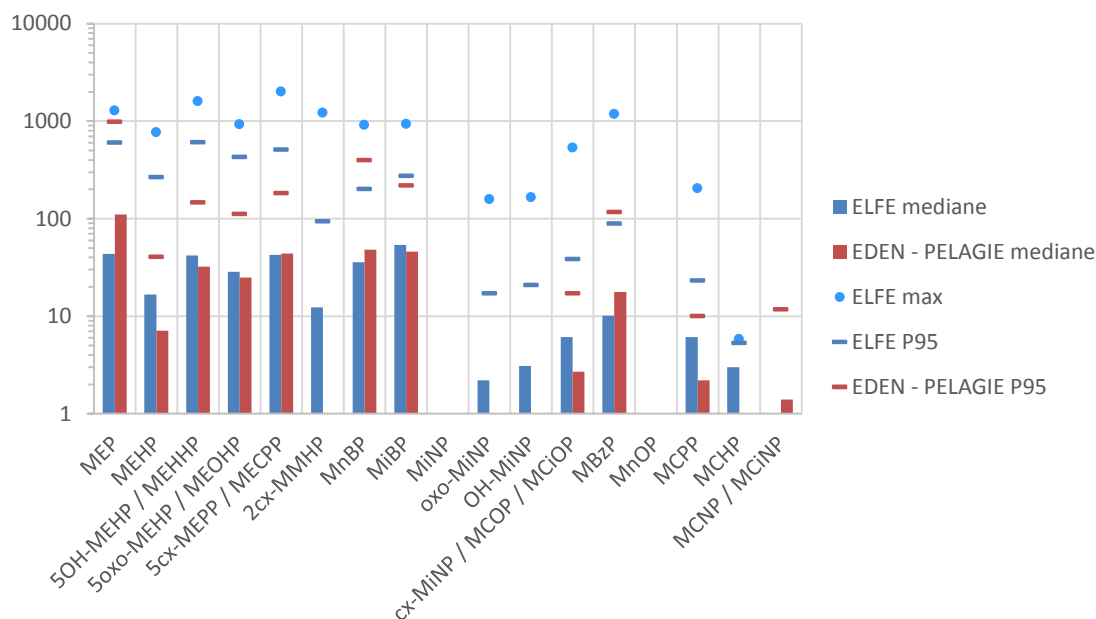


Figure 2: Concentrations urinaires en métabolites de phtalates retrouvés chez les volontaires inclus dans les cohortes françaises EDEN, PELAGIE et ELFE.

Les concentrations les plus élevées sont observées pour les métabolites des phtalates parents DEP, DEHP, DBP (ou DnBP) et DiBP. Les niveaux de concentration des monoesters métabolites du DiNP et du DnOP (MiNP et MnOP respectivement), recherchés au sein de la cohorte ELFE uniquement, étaient au-dessous des limites de quantification de la méthode utilisée. Cette observation est en accord avec des résultats rapportés dans des travaux antérieurs (Tableau 11) et semble liée au fait que ces monoesters ne sont pas les métabolites majoritaires des composés parents et ne représentent donc pas des biomarqueurs pertinents pour l'évaluation de l'exposition au DiNP et au DnOP.

Le MCHP n'était retrouvé que dans une faible part des échantillons de la cohorte ELFE (3,6%) et n'était pas recherché au sein des cohortes EDEN et PELAGIE. Le MCPP était également retrouvé dans une part limitée des échantillons provenant de la cohorte ELFE



(24%) mais beaucoup plus fréquemment détecté au sein des deux autres cohortes (98%), ceci étant probablement liée à la différence de sensibilité des méthodes (Tableau 10 : Métabolites de phtalates urinaires recherchés dans les cohortes EDEN, PELAGIE et ELFE, avec phtalates parents correspondants et performances des techniques analytiques utilisées.) dans la mesure où les valeurs médianes sont comparables.

L'étude de Zeman *et al.* rapporte des corrélations significatives entre les métabolites d'un même parent. Ceci est notamment le cas pour le DEHP, pour lequel les coefficients de corrélation entre les concentrations des différents métabolites (MEHP, 5OH-MEHP, 5oxo-MEHP, 5cx-MEPP et 2cx-MMHP) sont supérieurs à 0,97 ainsi que pour les métabolites du DiNP (oxo-MiNP, OH-MiNP et cx-MiNP) pour lesquels les  $R^2$  sont supérieurs à 0,82. Ces corrélations entre métabolites d'un même parents sont en accord avec des résultats d'études précédentes (Barr *et al.*, 2003 ; Koch *et al.*, 2003 ; Peck *et al.*, 2009).

L'étude de Zeman *et al.*, met en avant l'influence du mode d'accouchement sur la concentration urinaire en MEHP, avec une différence significative de la concentration moyenne de 69,02 µg/L dans les cas d'accouchement par césarienne ou forceps contre 44,64 µg/L lorsque l'accouchement avait lieu par voie naturel ( $p=0,02$ ). Cette différence de la concentration urinaire liée au type d'accouchement n'était toutefois pas observée pour les autres métabolites du DEHP (5OH-MEHP, 5oxo-MEHP, 5cx-MEPP et 2cxMMHP). Les concentrations élevées en MEHP, par rapport aux autres métabolites du DEHP signifieraient ainsi l'exposition récente des mères au DEHP, probablement en raison des interventions pratiquées en milieu hospitalier (perfusion, chirurgie...), comme cela avait été mis en avant dans une étude américaine (Yan *et al.*, 2009), et avait déjà souligné pour la cohorte ELFE par Vandetorren *et al.* (2011).

### Comparaison avec les études réalisées à l'étranger

Zeman *et al.* soulignent les concentrations urinaires en MEP basses (43,6 µg/L ) dans la cohorte ELFE en comparaison des valeurs rapportées dans les études étrangères allant de 117 à 380 µg/L (à l'exception des études asiatiques : 7,8 et 27,7 µg/L), mais également par rapport aux autres cohortes françaises (159,6 µg/L). Les auteurs relient l'exposition au parent, le DEP, à l'utilisation de produits cosmétiques et interprètent les faibles valeurs retrouvées dans ELFE comme liées à la faible utilisation de cosmétiques sur la période proche de l'accouchement, moment du prélèvement urinaire.

L'étude de Zeman *et al.* met également en avant l'exposition élevée des femmes enceintes françaises au DEHP et au DiBP, dont les métabolites urinaires étaient proches des valeurs rapportées dans les autres études européennes, mais nettement supérieures aux valeurs présentées dans la majorité des études américaines (Tableau 11).

Phtalate parent correspondant	Métabolite dosé	concentration médiane (µg/L)													
		France ELFE	France EDEN PELAGIE	Allemagne Wittassek <i>et al.</i> , 2009	Pays-bas Ye <i>et al.</i> , 2008	Israël Berman <i>et al.</i> , 2009	USA Adibi <i>et al.</i> , 2003	USA Swan <i>et al.</i> , 2005	USA Wolff <i>et al.</i> , 2008	USA Adibi <i>et al.</i> , 2008	USA Adibi <i>et al.</i> , 2009	USA Yan <i>et al.</i> , 2009	Japon Suzuki <i>et al.</i> , 2009	Taiwan Huang <i>et al.</i> , 2007	
DEP	MEP	43.5	110.2		117	165	236	128.4	380	202					
DEHP	MEHP	16.7	7.1		6.9	6.8	4.6	3.3	6	4.8	3.5	114.7	4	20.6	
	5OH-MEHP / MEHHP	41.9	32.3	10.5	14	21.5		11.4	20	19.9	11.2	108.9	10.6		
	5oxo-MEHP / MEOHP	28.5	25	12	14.5	17.5		11.1	17	17.5	9.9	95.1	11		
	5cx-MEPP / MECPP	42.7	43.8	27	18.4	26.7			35	37.1					
	2cx-MMHP	12.3		4.2											
DnBP	MnBP	35.7	48.1	23.7	42.7	30.8	42.6	13.5	36	35.5		14.8	57.9	81.1	
DiBP	MiBP	53.7	45.9	33.6	42.1	15.6		2.5	6.2	10.2		4.6			
DiNP	MiNP	<4													
	oxo-MiNP	2.2		1.3	2.2										
	OH-MiNP	3.1		2.5	2.5										
	α-MiNP / MCOP / MCIOP	6.1	2.7	5.6		3									
BBzP	MBzP	10.1	17.7	5	7.5	5.3	12.1	8.3	22	17.2		9.2	3.7	0.9	
DnOP	MnOP	<4			<LQ								<LQ		
	MCPP	6.1	2.2		1	1.3		2.1	3.2	2		1.6			
DCHP	MCHP	3													
DiDP	MCNP / MGINP		1.4												

Tableau 11: Concentrations urinaires en métabolites de phtalates rapportées dans différentes études.

## Niveaux d'exposition aux phtalates.

Dans l'étude de Zeman, une évaluation de la dose journalière a été effectuée à l'aide d'un modèle inversé basé sur la concentration des métabolites urinaires et intégrant la fraction du phtalate parent représenté par chacun des métabolites analysés. Les résultats d'évaluation de l'exposition journalière aux différents phtalates ont été comparés aux valeurs d'exposition limites proposées par l'European Food Safety Authority (EFSA, 2005) ainsi qu'aux valeurs de références fournies par l'United States Environmental Protection Agency (US-EPA, 2007).

Pour le DEP, DnBP, DiBP, DiNP et BBzP, les estimations de la dose journalière (médiane et P95) étaient nettement plus basses que les valeurs limites. Pour le DEHP, la dose journalière médiane a été estimée à 5,8 µg/kg /j et était également en dessous des valeurs limites. En revanche, le P95, avec une valeur de 65,1 µg/kg /j, était supérieur à la valeur de référence de 20 µg/kg /j proposée par l'US-EPA ainsi qu'à la dose journalière admissible de 50 µg/kg /j proposée par l'EFSA. Au total, 30% des échantillons urinaires ont conduit à une estimation de la dose journalière en DEHP supérieure à la valeur de 20 µg/kg /j, correspondant à la valeur de référence proposée par l'US-EPA ainsi qu'à la DJA proposée par l'EFSA pour les femmes en âge de procréer.

## 3.2 Données de toxicocinétique

### Principales conclusions de l'expertise collective de l'INSERM de 2011 :

Le métabolisme des phtalates conduit à la production de métabolites non oxydés et oxydés. Des études récentes semblent indiquer que chez l'homme, les principaux métabolites dans les urines sont les métabolites oxydés. La mesure des métabolites oxydés dans les liquides biologiques permet d'exclure les contaminations liées au matériel utilisé lors du dosage. La concentration maximum sanguine en MEHP (métabolite du DEHP) est 7,5 fois plus faible chez le primate non humain (singe) que chez le rat. Chez l'homme et le singe, le MEHP est présent dans le sang et l'urine essentiellement comme glucuroconjugué. Cependant, des métabolites de DEHP, avec des chaînes ester carboxylées, sont retrouvés sous formes conjuguées et libres dans les échantillons urinaires humains. Différents tissus peuvent être la cible de ces métabolites (testicule, ovaire...). Les différences dans l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion entre différentes espèces (rongeurs, singes et humains) peuvent expliquer des différences de sensibilité aux effets des phtalates.

## **Contenu de la littérature concernant la pharmacocinétique des phtalates**

Le mot "Phthalate" sur la base de données Pubmed fait référence à 6 463 articles référencés en date du 2 décembre 2013. Ce nombre est réduit à 382 lorsqu'on le combine aux mots "Pharmacokinetic" ou "Toxicokinetic" et en soustrayant les doublons. Ces références se répartissent comme suit; animaux = 152, humain= 93 et à la fois animaux et humain= 137). Pour le peu de temps qui est imparti et pour s'assurer d'orienter le prochain groupe de travail, une description générale dans ce chapitre est faite. Au besoin, ces différentes références peuvent être mises en annexe. Cependant, il n'est pas certain que tous soient pertinents, car n'ayant pas été regardés de façon systématique.

### **Absorption :**

Chang-liao *et al.* ont étudié l'absorption du DEHP par la voie orale. Les auteurs ont déterminé une biodisponibilité du DEHP est de 7% chez le rat soit 20% en DEHP est détectable dans sa forme originale dont 10.6% dans les fèces (Chang-Liao *et al.* 2013).

Lorber *et al.* ont développé un modèle PK classique en utilisant les phthalates di-n-butyl phthalate (DnBP) et le diisobutyl phthalate (DiBP) comme traceurs. L'observation majeure fut la dissymétrie entre les activités rapportées dans le formulaire de suivi et la quantité simulée. Ce résultat peut s'expliquer soit par le fait que l'exposition par les voies respiratoires est plus importante qu'anticipée ou encore par un relargage des métabolites des phthalates issu des compartiments d'une exposition antérieure à celle-ci (Lorber and Koch 2013).

L'exposition chez l'homme se fait principalement via la nourriture, l'eau incluant les voies d'expositions respiratoire et cutanée (Ventrice *et al.* 2013).

Une étude *ex vivo* percutanée d'exposition au DBP montre une hydrolyse complète par des estérases au moment de sa diffusion au travers la peau (Beydon *et al.* 2010).

Doan et al. ont étudié l'exposition transcutanée du DBP chez le cochon d'Inde. Avec une log Kow de 4,45 pour le DBP, on retrouve un % d'absorption exprimé en différence de la dose appliquée de 27,1% après 24 heures d'exposition (Doan et al. 2010). Une étude *ex vivo* sur des cellules de peau de cochon d'Inde a montré 60% de pénétration en 72h d'exposition.

### **Distribution :**

La limite de quantification du Dibutyl phthalate (DBP) dans le plasma et les fèces sont respectivement de 0,05 et 0,125 µg/mL chez le rat (Chang *et al.* 2013). Les auteurs rapportent qu'une administration par voie intraveineuse de 30 mg/kg. La cinétique est biphasique avec des  $t_{1/2}$  ( $\alpha$  et  $\beta$ ) respectivement de  $5.77 \pm 1.14$  et  $217 \pm 131$  min (Chang *et al.* 2013).

Les résultats de Doan *et al.* ont montré, à l'aide d'un modèle d'exposition *ex vivo* de peau de cochon d'Inde, l'importance du compartiment peau qui ralentit la diffusion du DBP dans le fluide de récolte. Ceci démontre l'utilité des modèles *ex vivo* pour des composés lipophiles afin d'étudier la capacité de rétention de ce compartiment (Doan *et al.* 2010).

Le MBP est le métabolisme majeur du DBP mesuré dans le plasma, l'embryon, le placenta et le liquide amniotique. Le MBP-G est présent, mais en concentration plus. Seulement un très faible % du produit parent est présent dans les tissus (Struve *et al.* 2009).

### **Métabolisme :**

Les phtalates sont de façon générale métabolisés en 2 phases. La première étape, est de phase 1 avec une hydrolyse (lipase ou hydrolase dans le GIT) suivie en seconde étape de la phase II par une conjugaison (UDP-glucuronosyl-transférase) rendant la molécule plus hydrosoluble pour une élimination dans l'urine (Ventrice *et al.* 2013).

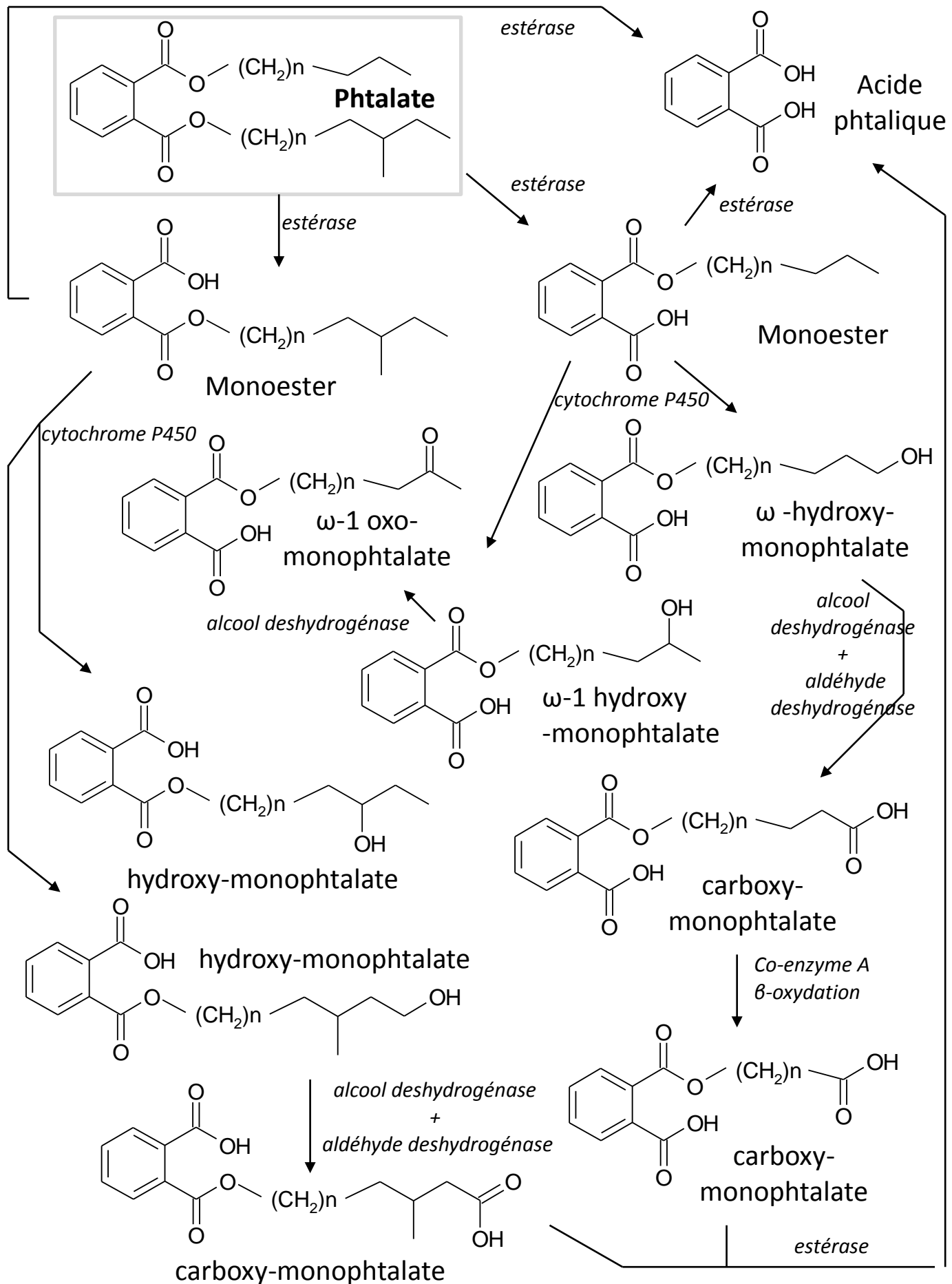
Le DBP est rapidement dégradé dans les premières 2 heures d'exposition suggérant un métabolisme rapide et au final une accumulation fécale faible chez le rat (Chang *et al.* 2013).

Monobutylphtalate (MBP) un métabolite du DBP a été mesuré pour chacune des couches. Par ordre de capacité les auteurs ont gradué les espèces et tissus revue comme suit : hairless rat > hairy rat > hairless mouse = lapin > cochon d'inde > Homme (Beydon *et al.* 2010). Ces différences inter espèces rappellent l'importance de bien caractériser la variabilité.

**Des études chez l'Homme ont montré qu'après un exposition orale le di(2-ethylhexyl) phtalate (DEHP), le diisononyl phtalate (DiNP) et le di(2-propylheptyl) phtalate (DPHP), se retrouvaient excrétés dans l'urine à des % respectifs de 74, 44 and 34% (Wittassek *et al.* 2009) (Annexe 1).**

### **Schéma métabolique commun aux phtalates**

La plupart des diesters de l'acide phtalique ayant des chaînes alkyles saturées subissent successivement les mêmes étapes de biotransformation (cf. Figure 3: Principales voies métaboliques de phase I des phtalates chez les rongeurs et chez l'Homme (d'après l'expertise collective de l'INSERM "reproduction et environnement", 2011). Les systèmes enzymatiques impliqués figurent en italiques.). La première de ces étapes est l'hydrolyse du phtalate de dialkyle en monoester. Cette hydrolyse est le fait des estérases présentes notamment dans le tube digestif. Ainsi, sous l'action de la lipase pancréatique, le phtalate de dibutyle est hydrolysé en phtalate de monobutyle, libérant la chaîne alkyle sous la forme d'un alcool primaire. En revanche, l'hydrolyse de la seconde liaison ester et la libération de l'acide phtalique ne se produit qu'en présence d'une estérase hépatique localisée dans le réticulum endoplasmique, comme cela a été montré pour le DEHP (Albro 1986). Les mono esters subissent ensuite une oxydation sur la chaîne alkyle qui peut avoir lieu sur le carbone terminal (oxydation en  $\omega$ ) ou subterminal ( $\omega-1$ ), mais aussi en position  $\omega-2$ . Ces oxydations sont produites par l'action des monooxygénases cytochrome P450 dépendantes. D'autres étapes d'oxydation peuvent avoir lieu, catalysées principalement par les aldéhydes deshydrogénases, et conduire à la formation d'un dérivé oxo ou d'un aldéhyde ; ce dernier, pris en charge par l'aldéhyde deshydrogénase, donnant lieu à une fonction carboxylique. Le métabolite carboxylé peut ensuite subir une série de  $\beta$ -oxydations ou de décarboxylations ce qui a pour effet de réduire la longueur de la chaîne carboxylée. Pour les phtalates ayant une chaîne alkyle ramifiée, comme c'est le cas pour le DiNP, le processus d'oxydation aura lieu préférentiellement sur l'un ou l'autre des carbones terminaux des branches de la chaîne. Les mono esters ainsi que les métabolites hydroxylés ou oxydés peuvent être éliminés sous cette forme ou après conjugaison à l'acide glucuronique. Ces voies métaboliques ont été étudiées et caractérisées sur un nombre limité de molécules telles que le DEHP ou le DBP (Annexe 2). Les informations concernant les autres phtalates sont plus restreintes (DiBP (Annexe 3 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), DnPP (Annexe 6), DPHP (Annexe 4), voire inexistantes. Parmi les composés examinés dans le cadre de cette saisine, aucune donnée spécifique n'a été identifiée concernant les voies de biotransformation du DPP, du DnHP, du DIUP, du DCHP et du DTDP.



**Figure 3:** Principales voies métaboliques de phase I des phtalates chez les rongeurs et chez l'Homme (d'après l'expertise collective de l'INSERM "reproduction et environnement", 2011). *Les systèmes enzymatiques impliqués figurent en italiques.*

Plusieurs publications concernent les voies de biotransformation du DINP (Annexe 4Annexe 5) et du DIDP (Annexe 5Annexe 6) chez les rongeurs. Elles font apparaitre un schéma métabolique conforme à celui décrit ci-dessus, avec une hydrolyse en monoester suivi de plusieurs étapes d'oxydation de la chaîne alkyle. Le DINP comme le DIDP sont constitués d'un mélange de plusieurs isomères, ce mélange d'isomères pouvant varier d'une formulation commerciale à une autre. Bien que le DINP et le DIDP soient respectivement constitués majoritairement de chaînes à 9 et à 10 atomes de carbones, des phtalates à chaîne plus courte ou plus longues sont également détectés dans chacun des mélanges. Il est donc probable que des constituants du mélange de DINP puisse également être présents dans le mélange de DIDP et inversement (Saravanabhavan et Murray, 2012). Ces caractéristiques rendent plus difficiles les études de métabolisme et le suivi des produits de biotransformation dans les excréta ou les fluides biologiques. En effet, l'exposition à ces mélanges donne lieu à un schéma métabolique complexe et rendent délicates les analyses chromatographiques des métabolites. Les travaux de Silva et al. (2006a) chez le rat ont cependant permis d'identifier et de quantifier un nombre important de métabolites urinaires du DiNP (cf. Tableau 12: Principaux métabolites urinaires de phase I du DiNP chez des rates exposées par gavage (300 mg/kg pc) à deux préparations commerciales de DiNP (CAS 68515-48-0 et CAS 28553-12-0). Les structures indiquées correspondant à un seul des isomères potentiels. Les métabolites sont classés par ordre décroissant d'abondance dans l'urine. (d'après Silva *et al.*, 2006)). Les analyses ayant porté sur des urines soumises à une hydrolyse préalable à la  $\beta$ -glucuronidase, seuls les métabolites de phase I ont été caractérisés. Comme attendu, il s'agit de monoesters ayant subi différentes étapes d'oxydation conduisant à des fonctions alcool, cétone ou carboxylique. Le métabolite majeur est le mono(carboxy-isoocetyl)phtalate (MCiOP), suivi du mono(hydroxy-isononyl)phtalate (MHiNP) et du mono(carboxy-isoheptyl)phtalate (MCiHpP). Il faut noter que le MiNP, utilisé parfois comme marqueur d'exposition au DiNP n'est présent qu'à l'état de traces dans les urines de rat (concentration environ 2000 fois inférieure à celle du MCiOP. Parmi les métabolites identifiés certains proviennent très probablement du DiOP ou du DiDP présents dans le mélange de départ ou encore peuvent avoir des origines multiples. Une étude du même groupe a recherché chez l'homme les principaux métabolites urinaires du DiNP (Silva et al, 2006b). Le MHiNP et le MCiOP ont été respectivement détectés dans 100 et 97% des échantillons analysés alors que la présence de MOiNP a été observée dans 87% des échantillons. Koch et Angerer (2007) ont également mesuré chez l'homme les taux urinaires de métabolites issus du DiNP. Ces auteurs montrent qu'environ 20% de la dose administrée est retrouvée dans l'urine sous forme de métabolites hydroxylé, les composés carboxylés et oxo représentant chacun approximativement 10% de la dose.

Métabolites	Origine présumée	Structure chimique
MCiOP	DiNP	
MHiNP	DiNP	
MCiHpP	DiNP*/DiOP	
MOiNP	DiNP	
MCiHxP	DiNP/DiOP/DiDP	
MHiDP	DiDP	
PA	DiNP/DiOP/DiDP	
MCP	DiNP/DiOP/DiDP	

Tableau 12: Principaux métabolites urinaires de phase I du DiNP chez des rates exposées par gavage (300 mg/kg pc) à deux préparations commerciales de DiNP (CAS 68515-48-0 et CAS 28553-12-0). Les structures indiquées correspondant à un seul des isomères potentiels. Les

métabolites sont classés par ordre décroissant d'abondance dans l'urine. (d'après Silva *et al.*, 2006).

MCiOP= mono(carboxy-isoocetyl)phtalate, MHiNP= mono(hydroxy-isononyl)phtalate, MCiHpP= mono(carboxy-isoheptyl)phtalate, MOiNP= mono(oxo-isononyl)phtalate, MCiHxP= mono(carboxy-isoheptyl)phtalate, MHiDP= mono(hydroxy-isdécyl)phtalate, PA= acide phtalique, MCPP= mono(3-carboxy-propyl)phtalate

\*Bien que Silva *et al.* (2006) indiquent uniquement le DiOP comme origine présumée du MCiHpP, il est probable que la  $\beta$ -oxydation du dérivé carboxylé du DiNP conduise également au MCiHpP.

### **Excrétion :**

DEHP est fortement métabolisé, peu importe la voie d'absorption, en mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP). D'ailleurs ce métabolite est utilisé comme biomarqueurs d'exposition. Cependant, le MEHP ne représente que 10% du DEHP qui a une courte  $t_{1/2}$ . Des métabolites ayant de plus longue  $t_{1/2}$  sont d'excellents biomarqueurs pour l'excrétion rénale (p.ex. 5-cx-MEPP, 2-cx-MMHP) tandis des biomarqueurs ayant de courtes demi-vies sont excellent pour des expositions récentes (5-OH-MEHP et le 5-oxo-MEHP) (Ventrice *et al.* 2013).

La demi-vie d'élimination du DINP est de  $158 \pm 58$  minutes pour une exposition intraveineuse de 10 mg/kg ou une exposition orale de 100 mg/kg. Hou *et al.*, ont estimé une biodisponibilité orale en DINP chez le rat de 1,19%. La quantité totale de DINP excrété en 48h est de  $13,99 \pm 4\%$  dans les fèces (Hou *et al.* 2013).

**Table 2 – Renal elimination of DEHP.**

67% of DEHP is eliminated as five major metabolites after 24 h

- 2-Ethyl-5-hydroxy-hexyl phthalate (23.3%);
- 2-Ethyl-5-carboxy-pentyl phthalate (18.5%);
- 2-Ethyl-5-oxy-hexyl phthalate (15%);
- Mono-2-ethyl-hexyl phthalate (5.9%);
- 2-Carboxy-methyl-hexyl phthalate (4.2%).

3.8% of DEHP was eliminated the second day as four major metabolites

- 2-Carboxy-methyl-hexyl phthalate (1.6%);
- 2-Ethyl-5-carboxy-pentyl phthalate (1.2%);
- 2-Ethyl-5-hydroxy-hexyl phthalate (0.6%);
- 2-Ethyl-5-oxy-hexyl phthalate (0.4%).

Seulement 0.18% de BBP est retrouvé dans les fèces dans les premières 48 heures (Chang *et al.* 2013).

### **Modèles pharmacocinétiques :**

Une interrogation de Pubmed (10 décembre 2013) a montré que peu d'auteur ont fait des modèles pharmacocinétiques sur les Phtalates. On ne retrouve que 3 groupes pour la modélisation PBPK et 1 groupe pour un modèle cinétique simple. Il faut préciser que plusieurs ont fait de la pharmacocinétique pour identifier des paramètres utilisés en cinétiques classiques. Cependant, cette section s'intéresse seulement aux modèles



pharmacocinétiques décrivant le devenir des phtalates dans l'organisme des mammifères incluant l'Homme.

### Les modèles PBPK

Un modèle PBPK décrivant la cinétique du di-(2-éthylhexyle) phtalate (DEHP) et son mono ester le MEHP chez le rat fût publié en 1999 (Keys *et al.* 1999). Selon les auteurs, il s'agit du premier modèle PBPK décrit dans la littérature sur les phtalates. Ce modèle comprend 5 compartiments (foie, tissus faiblement perfusés, tissus adipeux, testicules et tissus richement perfusés). On y retrouve aussi 1 pseudo-compartiment constitué de l'intestin grêle. Ce dernier permet les échanges lors de l'absorption orale, mais n'est pas perfusé pas la circulation systémique. Les auteurs intègrent, comme l'hypothèse la plus probante, le concept de diffusion limité, une rétention dans les compartiments en fonction du pH et de leur capacité d'ionisation ainsi que le cycle entérohépatique. Le modèle fût utilisé pour prédire la cinétique DEHP et de son métabolite le MEHP chez une population de rat Sprague Dawley d'environ 11 semaines pour une exposition orale et par intraveineuse. Les coefficients ont été déterminés expérimentalement et les données paramétriques proviennent de la littérature scientifique. Le modèle prédit une absorption rapide, mais une élimination lente du MEHP. La description du MEHP (considérer comme une grosse molécule par les auteurs) favorise une diffusion dans les tissus selon une diffusion limitée. Toujours selon les auteurs, la description d'un cycle entérohépatique sous-estime les prédictions suggérant que ce cycle est absent chez le rat. De plus, selon les auteurs, il semble que la description des concentrations dans les compartiments sur la base de l'ionisation des phtalates décrit mieux les observations expérimentales. Le foie est l'organe ayant eu la plus mauvaise prédiction. Le modèle décrit l'absorption gastro-intestinale du MEHP et du DEHP suivant une cinétique de 1<sup>er</sup> ordre. Cependant, le MEHP s'absorbe à 2 ordres de grandeur plus rapidement que le DEHP. À faible dose, les auteurs émettent l'hypothèse d'une hydrolyse du DEHP en MEHP directement dans le tractus gastro-intestinale augmentant la toxicité testiculaire. La description mathématique de l'influence du pH dans la distribution ne fût utilisée que pour les juvéniles et non chez l'adulte. Peu de précision sont données pour les raisons qui ont motivé ce choix sinon le manque de donnée. Les auteurs notent aussi que le Vmax de l'enzyme qui transforme le DEHP en son métabolite augmente soit en raison de l'augmentation de la taille du foie ou encore de l'induction des enzymes impliqués. Les auteurs concluent en prétendant que leur structure du modèle PBPK pourrait servir de base pour d'autres phtalates.

Le même groupe a publié un autre article en 2000 en prétendant vouloir développer un modèle PBPK générique afin de considérer tous les phtalates avec un seul modèle. (Keys *et al.* 2000). Dans ce second article, les auteurs ont évalué le modèle de 1999 avec le DBP et son métabolite le MBP. Selon eux, ce composé est intéressant, car moins lipophile. Les auteurs ont comparé différentes hypothèses, présenté dans l'article de 1999, à savoir le mode de diffusion dans les compartiments, l'influence de pH dans la rétention des phtalates dans les compartiments et le cycle entérohépatique. Ils arrivent à la conclusion que le modèle qui tient compte du pH présente la meilleure option pour un modèle PBPK générique. De plus, ils mentionnent qu'un modèle PBPK générique serait l'approche la plus réaliste pour l'évaluation des risques sanitaires chez l'Homme.

En 2003 Cahill *et al.* (du groupe de D. Mackay) ont développé un modèle PBPK générique afin de démontrer qu'un seul modèle pouvait être utilisé pour décrire la cinétique de différentes substances (Cahill *et al.* 2003). Ce modèle n'est pas spécifique aux phtalates. En utilisant ce modèle, il a montré qu'il pouvait décrire le di-butyle-phtalate et le di-(2-éthylhexyl)-phtalate, mais aussi différentes substances. Son modèle contient 10 compartiments intégrant plusieurs voies d'exposition. Chacun des compartiments du modèle est décrit comme une diffusion limitée. Aucune description de l'influence du pH ne semble

intervenir dans le modèle, comme ce fut le cas pour Keys et al (Keys *et al.* 1999; Keys *et al.* 2000). Les auteurs mentionnent dans leur discussion une prémisse que les Phtalates simulées (MBP et le MEHP) sont complètement ionisées, mais que pour augmenter la prédictibilité du modèle une discrimination entre ionisé et non ionisé serait souhaitable. Toujours selon les auteurs, l'utilisation d'un tel modèle PBPK nécessite l'ajustement d'un certains nombres de paramètres tenant compte des propriétés intrinsèques des substances modélisés.

Un autre modèle des phtalates fût publié par le groupe Mel Andersen d' "Hamner Institute" en Caroline du Nord É.-U. (Clewell *et al.* 2008). Ce modèle PBPK modélise le di-n-butylphtalate (DBP) chez la rate femelle gestante et ses métabolites le MBP-O, le MBP-G et le MBP. Le modèle est constitué de 5 compartiments notamment : foie, tissus richement et faiblement perfusés et le placenta. Il tient compte des mécanismes de transport (cycle entérohépatique, recirculation de l'excrétion urinaire et fécale et du transfert placentaire). Les auteurs notent que le métabolite oxydé joue un rôle majeur dans l'élimination urinaire. Ils observent que, des 40% qui sont éliminés dans la bile pas moins de 90% sont réabsorbés et remis en circulation. Les auteurs conclurent que le modèle prédit relativement bien les données animales pour permettre une extrapolation entre espèces à différent stade de vie.

### Les modèles Pharmacocinétique simple.

Un modèle pharmacocinétique simple (selon les auteurs) a été développée récemment par le groupe de Lorber et Koch (Lorber and Koch 2013). Ce modèle n'est pas un modèle PBPK, mais est intéressant, car il intègre la variation du DiBP ou du DnBP et de ses métabolites le MiDP, le OH-MiBP ou encore du MnDP, le OH-MnDP et le MCPD dans la circulation systémique et l'urine. Pour développer ce type de modèle, il faut partir de certaines prémisses, comme assumer une rapide et complète distribution du produit; présume que les enzymes se retrouvent dans le compartiment sérique, ce qui est transféré dans la bile n'est pas réabsorbé et le volume de distribution correspond à une constante et non un calcul dynamique comme le PBPK. Les auteurs ont aussi développé un modèle cinétique similaire pour le di-(2-ethylhexyl) phtalate DEHP (Lorber and Calafat 2012).

### Conclusion :

Au final, il apparait qu'un modèle PBPK générique représente une excellente option pour décrire les expositions environnementales aux phtalates. Ceci permettrait de simuler des mélanges de phtalates documentés dans la littérature. De plus, cette approche permettrait de considérer des interactions où des voies enzymatiques utilisées sont similaires, de même que de décrire la présence de métabolites communs. Le modèle pharmacocinétique simple est utile pour comprendre la cinétique au niveau des fluides biologiques (sang, urine et fèces), mais comporte d'importantes limitations comme rapportées par les auteurs.

Les voies métaboliques sont généralement communes à l'ensemble des diesters de l'acide phtalique ayant des chaînes alkyles saturées. La première étape est l'hydrolyse du dialkyl phtalate en monoester sous l'action des estérases présentes notamment dans le tube digestif (lipase pancréatique pour la première chaîne, estérase hépatique pour la deuxième).

Les monoesters subissent ensuite une oxydation sur la chaîne alkyle qui peut avoir lieu sur le carbone terminal (oxydation en  $\omega$ ) ou subterminal ( $\omega-1$ ), mais aussi en position  $\omega-2$ . Ces oxydations sont produites par l'action des monooxygénases cytochrome P450 dépendantes.

D'autres étapes d'oxydation peuvent avoir lieu et conduire à la formation d'un dérivé oxo ou d'un aldéhyde ; ce dernier, pris en charge par l'aldéhyde deshydrogénase, donne lieu à une fonction carboxylique. Le métabolite carboxylé peut ensuite subir une série de  $\beta$ -oxydations ou de décarboxylations ce qui a pour effet de réduire la longueur de la chaîne carboxylée.

Pour les phtalates ayant une chaîne alkyle ramifiée, comme c'est le cas pour le DEHP, le processus d'oxydation peut avoir lieu sur l'une ou l'autre des branches de la chaîne, ainsi que sur différents atomes de carbone, ce qui se traduit par un nombre important de métabolites différents.

Les phtalates mono esters ainsi que les métabolites hydroxylés ou oxydés peuvent être éliminés sous cette forme ou après conjugaison à l'acide glucuronique.

En fonction de la longueur de la chaîne carbonée, les métabolites sont préférentiellement éliminés dans l'urine (chaîne courte) ou les fèces (chaîne longue). Le lait constitue également une voie d'élimination des phtalates, principalement sous la forme monoester.

### **Autre modèle d'étude**

Les auteurs ont revu les différentes techniques présente ou future pouvant être utilisé tel que la génomique, et le *in silico* pour informer des différences dans les réponses en fonction des espèces étudiées (Burgess-Herbert and Euling 2013).

## **3.3 Effets sur le système reproducteur mâle**

***Principales conclusions issues du rapport d'expertise de l'INSERM (2010 - 2011) (cf : Annexe 8):***

### ***-Etudes épidémiologiques :***

Plusieurs études montrent que, chez l'homme, certains phtalates sont retrouvés dans les urines, les plasmas sanguin, le plasma et séminal.

Concernant les relations entre exposition aux phtalates et malformation congénitale, une étude menée par Swan et coll. (2008) a montré une possible relation entre certains métabolites oxydés des phtalates (MEHHP, MEOHP) et la distance anogénitale chez le garçon à la naissance. Toutefois, plusieurs limites méthodologiques majeures amènent à considérer les résultats de cette publication comme peu probants.

D'une manière générale, les preuves sont très limitées pour conclure à l'existence d'un rôle des phtalates sur la survenue des anomalies de l'appareil génital du petit garçon (hypospadias, cryptorchidie), ainsi que sur le risque de puberté précoce (en particulier chez les fillettes).

La majorité des études chez l'homme adulte retrouvent une association entre les concentrations de phtalates et une altération des paramètres du sperme (concentration et la morphologie des spermatozoïdes) ainsi qu'une augmentation de la fragmentation de l'ADN du gamète mâle. Cependant, d'autres études ne retrouvent pas d'effets des phtalates sur les paramètres du sperme. Par ailleurs, une étude de type exposé/non exposé met en évidence une relation entre des concentrations élevées de phtalates et des concentrations basses de testostérone.

En conclusion, les rapporteurs de l'INSERM soulignent :

**1) La difficulté de réaliser une synthèse eu égard aux modalités très diverses des études (transversale, cas/témoin, exposé/non exposé), aux populations étudiées, à la méthodologie des dosages et leurs limites de détection ainsi que dans les critères de jugement.**

2) Le fait que ces études sur les phtalates n'abordent pas les autres facteurs xénobiotiques possibles d'exposition.

3) La nécessité de réaliser de larges études prenant en compte comme critère de jugement les paramètres de la fonction de reproduction comme les aspects quantitatifs mais également qualitatifs du gamète tout en recherchant l'exposition à plusieurs xénobiotiques et facteurs de risques pour la spermatogenèse.

#### ***-Études chez l'animal mâle***

« Les études de références ayant servi à la détermination de la DJT pour le DEHP et le DBP ont été conduites dans trois lignées de rat (Sprague-Dawley, Wistar, Fisher). Les expositions ont été effectuées pendant la gestation et/ou la période néonatale ou encore sur plusieurs générations. Une atteinte testiculaire et des pathologies des organes sexuels mâles accessoires tels que vésicules séminales, prostate, épидидyme ont été rapportées à différents stades du développement. De nombreuses études rapportent une baisse du poids de la prostate, une diminution de la distance anogénitale, une augmentation des hypospadias ou cryptorchidies, une rétention d'aréoles mammaires ou de mamelons, une diminution de la longueur du pénis. Les effets sont signalés aux doses de DEHP et de DBP de 150 et 500 mg/kg/j. Les mêmes effets peuvent être obtenus à des doses plus faibles (100 mg) en présence des deux phtalates. Par ailleurs, il semble que certaines lignées de rat puissent être sensibles à des doses de 10 à 100 mg/kg/j.

Des modifications des caractéristiques spermatisques (taux de spermatozoïdes, morphologie) et des altérations des taux d'hormones (testostérone, LH...) sont observées après exposition au DEHP et au DPB (doses supérieures à 100 mg/kg/j) chez le rat ou le lapin. Le DBP réduit la production de testostérone foetale, mais cet effet disparaît rapidement après l'arrêt du gavage. La plupart des études ayant suivi la production de testostérone pendant la vie postnatale montre qu'à l'âge adulte les taux plasmatiques de testostérone des mâles traités in utero sont comparables à ceux d'animaux non exposés. Une baisse de la fertilité n'est rapportée que pour des doses élevées (doses supérieures à 500 mg/kg/j).

Chez le singe mâle (marmouset, cynomolgus), ces effets sont retrouvés après exposition à ces deux phtalates (aux mêmes doses) mais de manière moins évidente que chez le rat.

#### ***Organes et tissus cibles chez le mâle***

La très grande majorité des études chez le rat, réalisées par gavage durant la gestation, rapportent des effets sur les trois principaux types cellulaires du testicule foetal : cellules de Leydig, cellules de Sertoli et cellules germinales. Les travaux signalent de manière cohérente une agrégation des cellules de Leydig et la diminution de la production de testostérone et d'INSL3 de ces cellules pendant la vie foetale ce qui conduit à inhiber la masculinisation ou le développement des organes reproducteurs androgéno-dépendants. Cet effet n'est pas observé chez la souris. Concernant les cellules de Sertoli, leur nombre et leur prolifération peuvent être inhibés transitoirement lors d'une exposition in utero chez le rat sans que l'on sache s'il s'agit d'un effet direct ou indirect via l'inhibition de la synthèse d'androgène. Concernant les cellules germinales foetales, on observe l'apparition de cellules multinucléées chez le rat et la souris après une exposition in utero avec le DEHP et le DPB. Le DEHP augmente également l'apoptose de ces cellules. Ce dernier effet est décrit chez le rat et également retrouvé dans les cultures organotypiques de testicule foetal humain et murin.

Chez le singe (marmouset) comme chez le rat, un retard de différenciation des cellules germinales foetales a été rapporté mais aucun effet notable sur la prolifération des cellules de Sertoli n'est décrit. »

### ***Données épidémiologiques postérieures à l'expertise de l'INSERM (2011)***

Ce chapitre s'appuie sur la synthèse de revues ou de rapports publiés postérieurement à l'expertise Inserm ainsi que sur l'analyse d'articles originaux publiés après 2010 (date de fin de la bibliographie de l'expertise de l'INSERM) (cf :Tableau 13 ci-dessous).

Chez l'homme adulte, la majorité des études retrouvent un lien entre les concentrations de phtalates urinaires (ou de leur métabolites) et une altération des paramètres du sperme, dont la concentration et la morphologie des spermatozoïdes ainsi qu'une augmentation de la fragmentation de l'ADN du gamète mâle. Cependant, quelques études ne mettent pas en évidence d'effets des phtalates sur les paramètres du sperme.

Ces études ne conduisent pas revoir les conclusions de l'expertise de l'INSERM. En conséquence, les effets des phtalates sur le système reproducteur masculin ne peuvent pas être considérés comme avérés sur la base des données épidémiologiques analysées.

Tableau 13 : Tableau récapitulatif des études épidémiologiques analysées (reproduction masculine)

Référence Titre de l'article	Type d'étude	Population investiguée	Mesure de BPA	Méthode analytique	Ajustements	Résultats / discussion	Qualité de l'étude
Carran M, Shaw IC  The New Zealand Medical Journal 2012; 125, 1358:52-63  New Zealand Malayan war veterans' exposure to dibutylphthalate is associated with an increase of cryptorchidism, hypospadias and breast cancer in their children	Cohorte rétrospective	Incidence des hypospadias, cryptorchidies, cancers du sein chez les enfants de vétérans ayant servis en Malaisie de 1948 à 1960, et exposés au DBP (acaricide) appliqué quotidiennement sur leurs vêtements (prévention du typhus) N=252 soldats	<b>Comparaison</b> de la dose théorique calculée (64mg/kg/jour) chez ces vétérans et du LOAEL relevé dans la littérature (50 mg/kg/jour - rat)		<b>Validation</b> par des interviews auprès d'un échantillon de ces vétérans portant sur leurs capacités à se souvenir d'avoir eu, 50 ans après les faits, des applications quotidiennes de DBP  <b>Utilisation de questionnaires postaux</b> auprès de 252 soldats ayant servi dans les services d'urgence en Malaisie de 1948 à 1960 (via des données statistiques militaires) et résidant au moment de l'étude dans la province de Canterbury  <b>Questionnaire portant sur :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- vérification de leurs états de soldats,</li> <li>- vérification de leurs expositions quotidiennes au DBP,</li> <li>- leur descendance (naissances d'enfants ou de petits-enfants au cours de leur séjour en Malaisie et à leur retour ainsi que de la survenue chez ceux-ci d'hypospadias, de cryptorchidies, de cancer du sein, de puberté précoce, de faible numération des spz, d'infécondité, de désordres ovariens ou utérins)</li> </ul> / entretien téléphonique en cas de réponses peu claires // en cas de réponses positives au dernier item « pathologies », prise de contact et vérification directe auprès de la personne concernée  <b>Reconstitution des vêtements</b>	<b>N=252</b> 85/252 ont retournés le questionnaire (34%) 13 exclusions (non exposés) <b>N= 71 (inclusion réelle)</b>  <b>Pathologies dans la descendance</b> 58/71 ont eu, après leur retour en Nouvelle Zélande, 155 enfants, 79 garçons et 76 filles  <u>Cryptorchidie</u> : 5.1% (4 cas) (chez les exposés versus 1.1% en population générale - (p<0.05)  <u>Hypospadias</u> : 2.5% (2 cas) chez les exposés versus 0.3% en population générale - (p<0.05)  <u>Cancer du sein</u> : 4.0% (3 cas) chez les exposés versus 0.48% en population générale - (p<0.05)  NS pour les autres pathologies  <b>Absorption du DBP via les vêtements</b> Taux d'application du DBP calculé de 23mL pour les pantalons et de 7mL pour les chemises ; en prenant un taux d'absorption minimale de 0.22g/ml, la dose minimale d'exposition cutanée serait de 6.6g et, pour une absorption cutanée estimée à 68%, l'absorption réelle serait alors de 4.5g.  Considérant le poids moyen de ces soldats égal à 70kg, la dose quotidienne absorbée par ces vétérans est alors estimée à	<b>Points forts :</b> Étude de cohorte Bonne étendue de la durée de suivi Utilisation d'indicateurs d'exposition quantitatifs Utilisation de données de registre  <b>Points faibles :</b> <b>Nombre de sujets inclus très faibles</b> (252) – recrutement régional <b>Taux de réponses de seulement 34%</b> <b>Biais majeur possible de mémorisation sélective</b> : seuls les vétérans ayant eu une descendance avec ces pathologies pourraient avoir répondu au questionnaire (de plus, biais de mémorisation générale lié à l'âge élevé et biais d'information pour les personnes décédées)  Pas d'information sur durée d'inclusion de la période post-retour en Nouvelle Zélande  Nombre de cas de ces pathologies très faibles (<5) mais étonnamment élevé par rapport à la littérature internationale lorsque ces nombres sont rapportés en taux d'incidence (par exemple, incidence observée de cryptorchidie de 5%, incidence observée de cancer du sein de 4%)  Pas de précisions sur la survenue de ces pathologies sur les enfants versus les petits-enfants  Pas de prise en compte de l'alimentation (phytoestrogènes par

					utilisés lors de la guerre en Malaisie – application de 1mL de DBP (correspondant à la dose reçue par les soldats) et mise en contact avec des vêtements en coton similaires à ceux utilisés par ces soldats – <b>calcul de l'absorption de DBP dans les tissus par spectrophotométrie</b>	4.5g/70kg = <b>64mg/Kg/jour.</b>	voie alimentaire), du stress Exposition possible au DBP au retour de Malaisie non documentée  Données d'exposition approximatives et basées uniquement sur des hypothèses en cascades  Pas d'information sur les expositions postérieures au retour en Nouvelle Zélande Comparaison du LOAEL théorique humain et LOAEL chez le rat <b>Conclusion : faible niveau de preuve</b>
Hougard KS, Hannerz H, Feveile H, Bonde JP. <b>Reproductive Toxicology 2009; 27: 186-189.</b>  Increased incidence of infertility treatment among women working in the plastics industry	Cohorte historique	patients inféconds recrutement hospitalier de 1995 à 2005  Relation infécondité et travailler dans les industries « plastifiantes»	Exposé = avoir travaillé de manière régulière dans une entreprise de fabrication de plastiques, indication obtenu lors de l'admission à l'hôpital via la notification de profession (utilisation du Danish Industrial Classification of All Economics Activities ; 1993)  Non-exposé = ne pas avoir travaillé dans une entreprise de fabrication de plastiques  <b>Couples inféconds (infécondité &gt; une année)</b> Hommes de 20 à 59 ans (sans précision		Standardisation sur CSP, âge, revenu	Travailleurs « suivis » dans la plasturgie : 27 445 personnes années pour les femmes 93665 personnes années pour les hommes  107 cas d'infécondités féminines retrouvées chez les « femmes exposées aux plastifiants » pour un nombre attendu de 87, soit un RR (risque relatif RR) de <b>1.23 (1.01-1.48).</b>  41 cas d'infécondités masculines retrouvées chez les « hommes exposés aux plastifiants » pour un chiffre attendu de 50, soit un RR de <b>0.82 (0.59-1.11).</b>	<u>Points forts</u> Bonne étude de cohorte – recrutement sur 11 années – bonne équipe de recherche  <u>Points faibles</u> Classement des personnes exposés dans « plastiques » très insuffisante et uniquement lié à la notification des individus dans leurs dossiers médicaux (via le Danish Industrial Classification of All Economics Activities ; 1993) – aucune donnée sur poste de travail et le niveau réel d'exposition  Très faible nombre de cas d'infécondités masculines limitant d'autant l'observation d'effets possibles Pas d'ajustement sur tabac, contraception, obésité et mode de vie RR à la limite de la signification chez les femmes RR non significatif chez les

			Femmes de 20 à 39 ans (toutes causes)				hommes <b>Conclusion : TRES FAIBLE niveau de preuve</b>
Mendiola J. <i>et al.</i> International Journal of Andrology 2012, 34: 369-378.	Etude prospective	Recrutement via la cohorte « Study for Future Families » ; couple dont la femme est enceinte (sans PMA) recruté dans les consultations prénatales entre 1999 et 2005 (plusieurs sites aux USA) – questionnaire pour les hommes et 1 prélèvement urinaire et sanguin (même jour) SFF sur les patientes incluses via leurs dossiers médico-obstétricaux (âge gestationnel, rang de naissance, âge de la mère, tabac) Dosages de MEHP, MEHHP, MEOHP, MECPP, MCP, MEP, MBzP, MCNP, MCOP, MiBP, MBP – FSH, LH, SHBG, testostérone, FAI (testostérone totale/SHBG x 100) - Testostérone libre (à partir de la testostérone totale, albumine, et SHBG via l'équation de Vermeulen – réf donné – 1999) - Relation entre hormones reproductives et somme des métabolites du DEHP Régressions logistiques - sn cas				Sur les 950 hommes participant à la cohorte SFF, 425 ont eu les dosages en intégralité et seulement 363 ont finalement été inclus (avec l'ensemble des informations sollicités) Testostérone totale, libre et FAI significativement corrélé (à la baisse) avec les 4 métabolites urinaires du MEHP mais après ajustement différence non significative sauf pour FAI – SHBG significativement lié avec MEHP mais différence non observée après ajustement	Exposition au DEHP chez les hommes féconds pourrait être associée à des altérations mineures des marqueurs de la testostérone libre  Rôle possible (négatif) des phtalates (MEHP) sur les cellules de Leydig - rôle potentiel du MEHP sur la SHBG au niveau hépatique  Limite forte liée à un seul prélèvement urinaire  <b>Etude retenue (malgré les imites inhérentes à un prélèvement urinaire unique) montrant l'absence globale d'effet des métabolites des phtalates sur les hormones reproductives, excepté un possible effet, faible, sur la testostérone libre et plus spécifiquement sur la SHBG</b>



		de concentration inférieure à la LOD, application d'une LOD/2					
Suzuki Y, <i>et al.</i> International Journal of Andrology 2012, 35: 236-244.	Etude prospective (modalités précises et dates d'inclusion inconnues) menée dans le centre hospitalier des Forces de Défenses de Tokyo	344 femmes enceintes recrutées via leur gynécologue et ayant accepté de donner un échantillon d'urines et de faire examiner leur enfant à la naissance 120/344 ayant accouchées en dehors du centre hospitalier des Forces de Défenses de Tokyo n'ont pas été incluses - 111/244 femmes ayant accouchées dans le centre hospitalier des Forces de Défenses de Tokyo et ayant donné naissance à un garçon, constituent la population d'étude		Information sur les patientes incluses via leurs dossiers médico-obstétricaux (âge gestationnel, rang de naissance, âge de la mère, tabac)  Un prélèvement urinaire (réceptif en polypropylène) effectué entre la 9ème et la 40ème semaine Dosages de MMP, MEP, MnBP, MBzP, MEHP, MEHHP, MEOHP – dosages des isoflavones urinaires - correction des dosages faites en utilisant la « gravité spécifique urinaire » ... pour éliminer les effets de dilution ?  A la naissance, mesure de la distance anogénitale (AGD) en AG1 et AGD selon le bord génital		1. Relation statistiquement significative, « négative », entre MEHP et AGI 1 - p=0.05 2. AGI 1 et AGI2 augmentés en cas d'usage de tabac chez la femme versus non-usagère – p=0.03 et p=0.05 conformes aux données de la littérature sur facteurs de risques du cancer du sein (parité, allaitement, date du premier enfant, BMI).  Dans le modèle de régression multiple persistance de la relation significative entre MEHP et AGI1 (relation négative – p=0.02) entre MEHP et âge maternel (relation positive – p=0.04), entre MEHP et tabac (relation négative – p=0.02)	<u>Etude non retenue</u> Dosage urinaire unique – pas d'information sur de possibles expositions professionnelles antérieures ou au moment du prélèvement urinaire  Biais majeur lié à la fiabilité de la mesure de la distance anogénitale (multiplicité des évaluateurs)  Résultats statistiques peu robustes – faible nombre de personnes incluses

				retenu – l'AGD 2 semblant correspondre à la distance anoscotale utilisée dans l'étude de Swan en 2005 ! Mesures anogénitales effectuées par 23 cliniciens / ajustement en fonction du poids de l'enfant à la naissance donnant un index de la distance « AGI », soit AGI1 et AGI2			
Joensen U. N., <i>et al.</i> Phtalate excretion pattern and testicular function: a study of 881 healthy Danish men <b>Environmental Health Perspectives, 2012.</b>	Etude « fortement » exposés versus « peu » exposés, réalisée au sein d'une cohorte historique.	<u>Descriptif des groupes</u> : Constitution à partir d'un échantillon représentatif de 881 hommes danois jeunes (moyenne = 19.5 +/-1.3), de sous-groupes classés selon le niveau d'exposition (fort versus faible, en utilisant les quartiles - en pratique comparaison du quartile le plus bas versus le quartile le plus haut) au principal métabolite des diesters phtalates, le MEHP (mono 2-ethylhexy phtalate).  <u>Paramètres utilisés</u> : Principaux indicateurs sociodémographiques		<u>Analyses statistiques</u> : Prise en compte des facteurs de confusion et ajustements, transformation logarithmique de certaines variables, analyses de régression.		Niveau détectable > 95% des métabolites des phtalates Différence très significative de la SHBG, pour le MEHP, entre le quartile le plus élevé et le plus faible Différence significative (mais p= 0.03) pour la FSH. Le FAI et le FAI/LH apparaissent également très significatifs mais ces résultats sont essentiellement dus à la SHBG !!! Aucune différence significative (après ajustement) pour les différents paramètres spermatiques – en pratique seul le volume spermatique montrait un p égal à 0.01	Etude de très bonne qualité méthodologique (et nettement supérieure aux études précédentes sur le même sujet, eu égard en particulier au nombre d'individus enrôlés, aux méthodes diagnostiques et statistiques) et menée par une équipe reconnue dans le domaine. Peu de biais majeurs Utilisation statistique des quartiles justifiable certes mais allant dans le sens d'une prise en compte des plus grandes différences (utilisation et comparaison du quartile le plus bas versus le plus élevé, donnant alors prise aux valeurs très basses et très hautes) Utilisation des résultats « quelque peu abusif » pour le FAI et du FAI/LH, ceux-ci reflétant essentiellement la différence majeure observée dans le taux de SHBG ! Aucune différence quant aux paramètres spermatiques contredisant les quelques résultats ponctuels publiés sur ce domaine

		<p>,                  Dosages urinaires des phtalates,                  Taux des hormones reproductives (testostérone, LH, FSH, SHBG, Inhibine B, Estradiol, plus quelques ratios en particulier le taux d'androgène libre (FAI), calculée par testostérone totale x 100/SHBG)</p> <p>Principaux paramètres spermatiques.</p>					<p>et déjà soumis à de nombreuses critiques.</p> <p><b>En conclusion, une très bonne étude de référence ne montrant pas d'altération majeure et significative des hormones reproductives, ni des paramètres spermatiques, en fonction du niveau d'exposition aux phtalates (du moins, au métabolite MEHP); seule la SEGB sembler impliquée mais il semble difficile, à ce niveau, de proposer un mécanisme physiopathologique se rapportant uniquement à la SEGB.</b></p>
--	--	---	--	--	--	--	---

### 3.4 Données récentes chez l'animal postérieures à l'expertise Inserm : Effet d'une exposition fœtale et/ou néonatale sur le développement des fonctions de reproduction masculine.

Ce chapitre s'appuie sur la synthèse de revues ou de rapports publiés postérieurement à l'expertise Inserm ainsi que sur l'analyse d'articles originaux publiés après 2010 (date de fin de la bibliographie de l'expertise Inserm) (cf : Annexe 9 et Tableau 14).

#### Données relatives au diisononyl phtalate (DINP)

Ce chapitre s'appuie sur la synthèse de revues ou de rapports publiés postérieurement à l'expertise Inserm ainsi que sur l'analyse d'articles originaux publiés après 2010 (date de fin de la bibliographie de l'expertise Inserm) (Annexe 10).

L'étude de **Boberg et al. (2011)** est bien construite sans biais méthodologique. Elle permet l'identification d'un NOAEL à 300 mg/kg/j et un LOAEL 600 mg/kg/j pour le DINP.

Cependant l'extrapolation des données concernant l'effet antiandrogène du phtalate pour l'ERS du DiNP serait critiquable, cet end-point n'étant pas sensible aux phtalates dans l'espèce humaine.

L'étude de **Clewell et al. (2013)** est bien construite sans biais méthodologique. Elle permet l'identification d'un NOAEL à 50 mg/kg/j et un LOAEL à 250 mg/kg/j pour le DINP.

Cependant l'extrapolation des données concernant l'effet antiandrogénique du phtalate pour l'ERS du DINP serait critiquable, cet end-point n'étant pas sensible aux phtalates dans l'espèce humaine.

L'étude de **Clewell et al. (2013)** est bien construite sans biais méthodologique. Elle permet l'identification d'un NOAEL à 50 mg/kg/j et un LOAEL à 250 mg/kg/j pour le DINP.

Cependant des études morphométriques auraient permis de conforter (ou d'invalider) les NOAEL de cette étude. Enfin, l'extrapolation des effets antiandrogéniques de cette étude à l'espèce humaine doit être prudente.

L'étude de **Adamsson et al. (2009)** est bien construite sans biais méthodologique et réalisée par une des meilleures équipes mondiales de la discipline. Elle permet l'identification d'un NOAEL à 250 mg/kg/j et un LOAEL à 750 mg/kg/j pour le DINP.

Cependant le protocole choisi est peu propice à la détection des effets du traitement puisque le délai entre l'arrêt du traitement et l'observation (48h) est anormalement trop long.

Enfin, aucun des « endpoints » choisis dans cette étude n'est sensible aux phtalates dans l'espèce humaine. L'extrapolation des résultats de cette étude à l'espèce humaine peut donc souffrir de biais importants.

L'étude de **Borch et al. (2004)** montre une réduction de la production testiculaire de testostérone est de même importance après traitement par DINP 750 mg/kg/j et DEHP 300 mg/kg/j. Cette étude montre un effet cumulatif du DINP à 750 mg/kg/j et du DEHP à 300

mg/kg/j. Elle permet de montrer un pouvoir antiandrogène plus faible pour DINP que le DEHP. L'effet du DINP à 750 mg/Kg/j. est égale celui du DEHP à 300 mg.Kg/j.

L'étude de **Gray et al. (2000)** est une étude historique de comparaison des effets antiandrogènes et reprotoxiques de différents phtalates conduite avec un grand nombre d'animaux et par une équipe pionnière et reconnue. Certains «end points» choisis dans cette étude ne sont pas sensibles aux phtalates dans l'espèce humaine.

L'étude de **Hannas et al. (2011)**, montre que pour le DINP, les effets observés étaient les mêmes que pour les deux autres phtalates mais de manière moins importante que ce soit pour la testostéronémie foétale ou pour l'expression des gènes Star et Cyp11a.

## **Données relatives au diisobutylphtalate (DIBP)**

Ce chapitre s'appuie sur la synthèse de revues ou de rapports publiés postérieurement à l'expertise Inserm ainsi que sur l'analyse d'articles originaux publiés après 2010 (date de fin de la bibliographie de l'expertise Inserm) (cf :Annexe 11).

**Saillenfait et al. (2006)**, montrent un retard dans la migration transabdominale des testicules dans les groupes exposés à 500 et 750 mg/kg/j.

Remarque : la descente transabdominale des testicules dépend de la production par les cellules de Leydig foetales d'Insl3 et non pas de testostérone. D'où une difficulté de comparaison avec les autres articles qui étudient des effets antiandrogéniques.

En conclusion, un NOAEL à 250 mg/kg/j et un LOAEL à 500 mg/kg/j peuvent être retenus pour le DIBP. Mylchreest *et al* (2000) *Toxicol Sci* 55 : 143-155. Les auteurs utilisent un protocole comparable (gavage par le DBP de 12,5 jpc à 21,5 jpc). Ils déterminent un NOAEL de 100 mg/kg/j et un LOAEL de 500 mg/kg/j pour la réduction de la DAG à 0 jpp, et un NOAEL de 50 mg/kg/j et un LOAEL de 100 mg/kg/j pour la rétention des mamelons à 13 jpp.

L'équipe de **Hannas et al. (2011)** a montré une diminution significative de la production de testostérone foétale a pu être observée (300mg/kg/j) ainsi qu'une diminution significative de l'expression de deux gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, StAR et CYP11a1 (300mg/kg/j et 100mg/kg/j, respectivement).

Dans l'étude de **Saillenfait et al. (2006)**, aucun effet n'a été mis en évidence sur les paramètres de gestation. Le poids des mâles était diminué significativement à J1 et J21 uniquement pour la dose 625 mg/kg/j. La distance anogénitale était aussi diminuée significativement dès la dose 250 mg/kg/j. Une augmentation du nombre de malformations (cryptorchidie, hypospadias) était mise en évidence ainsi qu'une diminution, à l'âge adulte, du poids des testicules, épидидymes, vésicules séminales et prostate. Un retard pubertaire significatif a aussi été observé dès 500 mg.kg/j.

## **Données relatives au di-n-heptylphtalate (DHPP) et au di-n-**

### **octylphtalate (DnOP)**

Ce chapitre s'appuie sur la synthèse de revues ou de rapports publiés postérieurement à l'expertise Inserm ainsi que sur l'analyse d'articles originaux publiés après 2010 (date de fin de la bibliographie de l'expertise Inserm) (cf :Annexe 12).

L'étude de **Saillenfait *et al.* (2011)** est bien faite sans biais méthodologique cependant elle est essentiellement morphologique et aurait été plus sensible avec des analyses histologiques et fonctionnelles. De plus, elle s'arrête à la fin de la vie fœtale sans suivi postnatal. Elle permet d'identifier un LOAEL de 250 mg/kg/j pour les 2 phtalates étudiés (DHPP et DnOP) avec comme effet observé la présence d'une côte lombaire surnuméraire.

#### 3.4.1.1.1 Données relatives au diisooctyl phthalate (DIOP)

Ce chapitre s'appuie sur la synthèse de revues ou de rapports publiés postérieurement à l'expertise Inserm ainsi que sur l'analyse d'articles originaux publiés après 2010 (date de fin de la bibliographie de l'expertise Inserm) (cf :Annexe 13).

**Saillefait et al. (2013)**, ont étudié le DIOP en réalisant trois protocoles : 1/des femelles gestantes (SD) ont été exposées à 0, 0,1, 0,5, 1 g/kg/j de DIOP par gavage entre jpc 6 et 20 avec un temps d'observation à jpc 21. Une augmentation des pertes post implantatoires et des points de résorption a pu être observée pour la dose maximale ainsi qu'une diminution du poids des fœtus à 0,5 et 1 g/kg/j et l'existence de testicules non descendus à 1 g/kg/j. Un retard d'ossification a aussi été noté à 0,5 et 1 g/kg/j; 2/ des rattes gestantes ont été exposées au DIOP à différentes doses 0, 0,01, 0,1, 0,5, 1 g/kg/j de jpc 12 à 19 avec un temps d'observation à jpc 19. Une diminution significative de la production ex vivo de la testostérone fœtal a pu être observée dès 0,1 g/kg/j; 3/la dernière exposition a permis d'exposer toujours des rattes gestantes de jpc12 à 21 à différentes doses de DIOP (0, 0,1, 0,5, 1 g/kg/j) avec des temps d'observation après la naissance en prépubertaire (j21-22), en postpubertaire (j 68-71) et à l'âge adulte (j 82-84). Des anomalies du système reproductif mâle comme l'hypospadias, les testicules non descendus, la diminution des poids bruts et relatifs des testicules et des épидидymes ainsi que des anomalies histologiques avec une "hypospermatogenèse" ont pu être observés pour le groupe 1g/kg/j.

#### 3.4.1.1.2 Données relatives au dipentylphthalate (DnPeP) – Effet d'une exposition fœtale et/ou néonatale sur le développement des fonctions de reproduction masculine

Ce chapitre s'appuie sur la synthèse de revues ou de rapports publiés postérieurement à l'expertise Inserm ainsi que sur l'analyse d'articles originaux publiés après 2010 (date de fin de la bibliographie de l'expertise Inserm) (cf :Annexe 14).

L'équipe de **Hannas et al. (2011)** a montré une réduction dose-dépendante de la production testiculaire de testostérone chez le fœtus après exposition de la mère entre le 14<sup>ème</sup> et le 18<sup>ème</sup> jour de gestation. Cette étude permet d'identifier un NOAEL de 11 mg/kg/j ; un LOAEL de 33 mg/kg/j et un ED50 de 46 mg/kg/j.

Par comparaison avec les autres, l'effet anti androgène du DPeP est 2 à 9 fois plus important que celui du DEHP étudié précédemment par la même équipe (E Gray) dans les mêmes conditions expérimentales (Howdeshell *et al.* 2008 ,Toxicol Sci 105 : 153-165).

- réduction de la production de testostérone NOAEL du DEHP = 100 (vs 11 pour DPeB), ED50 du DEHP = 388 (vs 47 pour DPeB),
- réduction de la DAG: NOAEL du DEHP = 300 (vs 33 pour DPeB), ED50 du DEHP = 521 (vs 257 pour DPeB),
- rétention des mamelons: NOAEL du DEHP= 300 (vs 100 pour DPeB), ED50 du DEHP= 785 (vs 175 pour DPeB).

L'étude analyse les effets antiandrogéniques des phtalates sur le testicule foetal de rat. Or cet effet n'a pas été retrouvé dans l'espèce humaine. L'extrapolation des résultats de cette étude à l'espèce humaine doit se faire avec prudence.

Le DPeP est 2 à 9 fois plus efficace pour réduire l'activité androgène du testicule foetal que ne l'est le DEHP.

Cependant l'extrapolation directe des données concernant l'effet antiandrogéniques du phtalate pour l'ERS du DPeP serait criticable, cet end-point n'étant pas sensible aux phtalates dans l'espèce humaine.

#### 3.4.1.1.3 Données relatives au di-n-hexyl phthalate (DnHP)

Ce chapitre s'appuie sur la synthèse de revues ou de rapports publiés postérieurement à l'expertise Inserm ainsi que sur l'analyse d'articles originaux publiés après 2010 (date de fin de la bibliographie de l'expertise Inserm) (cf : Annexe 15).

Une étude menée par **Saillenfait et al. (2013)**, a montré une diminution significative de la testostérone foétale dès 20 mg/kg/j; une diminution significative de l'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogenèse : SR-B1 (dès 20 mg/kg/j), StAR, P450ssc, P450C17 (dès 50 mg/kg/j) et  $3\beta$ HSD (dès 100 mg/kg/j) ainsi que des modifications histologiques touchant principalement les cellules de Leydig (diminution, agrégat,...). Un NOAEL de 5 mg/kg/j est proposé par les auteurs.

Une autre équipe a étudié le même phtalate en exposant par gavage des rattes gestantes Wistar (jpc 6-19), à différentes doses proches de l'étude réalisée par Saillenfait et coll. (0, 20, 100 ou 500 mg/kg/jour) et en observant les rats mâles à différents temps soit en période prépubertaire, pubertaire et adulte (**Ahbab et al., 2013**). Les résultats de ce travail montrent une diminution significative des poids relatifs des testicules (dès 100mg/kg/j en prépubertaire et pubertaire, et dès 20mg/kg/j chez l'adulte), une diminution significative des poids relatifs des vésicules séminales et des épидидymes uniquement au temps d'observation pubertaire (dès 500 mg/kg/j et 100mg/kg/j, respectivement). Les dosages hormonaux étaient aussi significativement modifiés avec une diminution de la testostéronémie dès 20 mg/kg/j, uniquement pour la période pubertaire.

Sur le plan histologique, des modifications étaient aussi observées : augmentation d'atrophie des tubules avec présence de vacuolisation. Les réserves spermatiques n'étaient pas modifiées, seul le nombre d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes était augmenté.



#### 3.4.1.1.4 Données relatives au diisooheptyl phtalate (DIHP)

Ce chapitre s'appuie sur la synthèse de revues ou de rapports publiés postérieurement à l'expertise Inserm ainsi que sur l'analyse d'articles originaux publiés après 2010 (date de fin de la bibliographie de l'expertise Inserm) (cf : Annexe 16).

De la même manière que pour le DIBP, Hannas et son équipe a étudié les effets du DIHP en utilisant les doses suivantes 0, 100, 300, 600 et 900 mg/kg/j. Les auteurs montrent que l'hCG augmente de manière significative la production de testostérone du testicule foetal dans chaque groupe d'environ 2,3 fois ce qui indique que la réponse des cellules de Leydig à un stimulus « LH-like » n'était pas compromise par le DIHP (**Hannas et al., 2011**).

#### 3.4.1.1.5 Données relatives au diundecyl et le ditridecyl phthalates (DUDP/DTDP)

Ce chapitre s'appuie sur la synthèse de revues ou de rapports publiés postérieurement à l'expertise Inserm ainsi que sur l'analyse d'articles originaux publiés après 2010 (date de fin de la bibliographie de l'expertise Inserm) (cf : Annexe 17).

Dans l'étude de **Saillenfait et al. (2013)**, aucun effet n'a été observé chez les femelles gestantes pour les 2 phtalates. La distance anogénitale n'a pas été modifiée. Le nombre de testicules non descendus n'était pas augmenté dans les groupes exposés.

#### 3.4.1.1.6 Données relatives au di-n-propyl phthalate (DnPP)

Ce chapitre s'appuie sur la synthèse de revues ou de rapports publiés postérieurement à l'expertise Inserm ainsi que sur l'analyse d'articles originaux publiés après 2010 (date de fin de la bibliographie de l'expertise Inserm) (cf : Annexe 18).

Selon le même protocole d'exposition décrit ci-dessus, l'équipe de Saillenfait a testé le DnPP à différentes doses (0; 0,5; 1 et 1,5 g/kg/j) (**Saillenfait et al., 2011**). Une diminution significative du poids des rats mâles a été observée pour la dose 1,5 g/kg/j ainsi qu'une diminution de la distance anogénitale à partir de 1g/kg/j. Il n'y avait pas d'effet sur la descente testiculaire.

#### 3.4.1.1.7 Données relatives au diallylphtalate (DAP)

Ce chapitre s'appuie sur la synthèse de revues ou de rapports publiés postérieurement à l'expertise Inserm ainsi que sur l'analyse d'articles originaux publiés après 2010 (date de fin de la bibliographie de l'expertise Inserm) (cf : Annexe 19).

L'équipe de Saillenfait, toujours avec le même protocole a testé le DAP (0, 100, 150, 200 et 250 mg/kg/j). Il n'y avait pas d'effets sur le nombre de sites d'implantation, de pertes post implantatoires, de foetus vivants. Le poids de l'utérus gravide était diminué de manière significative pour la dose 250 mg/kg/j ainsi que le poids des foetus (200 mg/kg/j et 250 mg/kg/j) mâle. Un retard d'ossification (250 mg/kg/j) et des anomalies du squelette (200 mg/kg/j et 250 mg/kg/j) ont aussi été observés.

### **Données récentes postérieures à l'expertise Inserm : Effet d'une exposition adulte sur les fonctions de reproduction masculine**

Ce chapitre s'appuie sur la synthèse de revues ou de rapports publiés postérieurement à l'expertise Inserm ainsi que sur l'analyse d'articles originaux publiés après 2010 (date de fin de la bibliographie de l'expertise Inserm) (cf : Annexe 20, Annexe 21, Annexe 22, Annexe 23, Annexe 24, Annexe 25, Annexe 26).

#### *3.4.1.1.8 Données relatives au Diéthylhexyl phtalate (DEHP)*

L'étude de **Desdoits-Lethimonier *et al.* (2012)**, montre que sur la lignée cellulaire NCI-H295R en culture pendant 3 jours,  $10^{-5}$ M de DEHP ou de MEHP réduit la production de testostérone pendant 2 jours de culture. L'effet du MEHP (mais pas du DEHP) disparaît le 3ème jour, une concentration de  $10^{-6}$  M de DEHP ou de MEHP n'ont pas d'effet.

Dans cette même étude sur des explants testiculaires humains en culture pendant 2 jours montre, la concentration de  $10^{-4}$ M de DEHP n'a pas d'effet pendant les 2 jours de culture.

La concentration de  $10^{-5}$ M de DEHP réduit la production de testostérone le premier jour mais pas le 2ème jour de culture, à  $10^{-4}$ M et  $10^{-5}$ M de MEHP est observé une réduction de la production de testostérone le premier jour mais pas le deuxième jour de culture. Enfin, le MEHP réduit la formation de prégénolone mais pas la transformation de prégénolone en testostérone. En conclusion, un NOAEL de  $10^{-6}$  M de MEHP ou de DEHP et un LOAEL de  $10^{-5}$  M de MEHP ou de DEHP est identifié.

Ce travail démontre de façon convaincante un fait nouveau majeur: le testicule adulte peut transformer le DEHP, considéré comme biologiquement inactif, en métabolites actifs. Ainsi, chez l'adulte, la concentration intratesticulaire en MEHP pourrait être plus élevée que la concentration plasmatique.

Tableau 14: Tableau récapitulatif des données expérimentales sur le système reproducteur mâle.

Auteur	Année	Phtalates étudiés	voie d'exposition	Doses	Période d'exposition	Espèce utilisée	Age à l'analyse	Effets observés	NOAEL / LOAEL
<b>Boberg et al. Reprod toxicol 31:200-209</b>	2011	DINP CAS#28553-12-0	gavage	0, 300, 600, 750 ou 900 mg/kg/j	GD 7 (6,5 jpc ?) à PND 17 (16 jpp ?)	Sprague Dawley	GD 21, PND 1, PND 13, PND 90	<p><b>1) toxicité générale / maternelle :</b> retard de croissance à pND 13 , compensé ultérieurement</p> <p><b>2) Reprotoxicité pendant le développement :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>GD21 :</b> gonocytes multinuclés et <math>\searrow</math> testo intratesticulaire à partir de 600 mg/kg/j</li> <li>- <b>PND1 :</b> <math>\searrow</math> DAG à 900 mg/kg/j</li> <li>- <b>PND 13 :</b> <math>\searrow</math> DAG à 900 mg/kg/j et non-disparition des mamelons à partir de 750 mg/kg/j.</li> </ul> <p><b>3) Reprotoxicité à l'âge adulte</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>PND 90 :</b> <math>\searrow</math> pourcentage de spermatozoïdes mobiles à partir de 600 mg/kg/j.</li> </ul>	<b>300 mg/kg/j / 600 mg/kg/j</b>
<b>Clewell et al. Reprod toxicol 35:56-69</b>	2013	DINP CAS#68515-48-0	gavage	0, 50, 250 ou 750 mg/kg/j	12,5 à 19,5 jpc	Sprague Dawley	19,5 jpc	<p><b>1) toxicité générale / maternelle :</b> Poids du foie maternel augmenté à partir de 250 mg/kg/j</p> <p><b>2) Métabolisme :</b> Les concentrations des métabolites sont 1,2 à 3 fois inférieures dans le plasma fœtal par rapport au plasma maternel.</p> <p><b>3) Reprotoxicité :</b> Apparition de gonocytes multinuclés à partir de 250 mg/kg/j . <math>\searrow</math> testostérone intratesticulaire 2h après le gavage diminuée à partir de 250 mg/kg/j.</p>	<b>50 mg/kg/j / 250 mg/kg/j</b>
<b>Clewell et al. Reprod toxicol 35:70-80</b>	2013	DINP CAS#68515-48-0 / DBP	nourriture	DINP : valeurs cibles 0, 50, 250 ou 750 mg/kg/j (0, 760 3800,1140 0 ppm)	de 12,5 jpc à 14 jpp	Sprague Dawley	2 jpp, 14 jpp, 49-50 jpp	<p><b>1) toxicité générale / maternelle :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\searrow</math> le poids corporel maternelle pour 750 mg/kg/j de DiNP à 20 jpc et à 2 et et 14 jpp.</li> <li>- <math>\searrow</math> poids corporel foetal pour 250 mg/kg/j de DiNP à 14 jpp.</li> </ul> <p><b>2) Reprotoxicité pendant le développement :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>2 jpp :</b> gonocytes multinuclés à partir de 250 mg/kg/j DiNP</li> </ul>	<b>50 mg/kg/j / 250 mg/kg/j</b>

Auteur	Année	Phtalates étudiés	voie d'exposition	Doses	Période d'exposition	Espèce utilisée	Age à l'analyse	Effets observés	NOAEL / LOAEL
				. DINP : valeurs mesurées : - gestation: ND, 56, 288, 720 - néonatal: ND, 109, 555, 1513 mg/kg/j . DBP: valeur cibles du : 500 mg/kg/j (7600ppm )				réduction de la DAG à 500 mg/kg/j de DBP mais jamais avec le DINP - <b>14 jpp</b> : ↘ DAG à 750 mg/kg/j De DiNP et 500 mg/kg/j de DBP rétention des mamelons avec 500 mg/kg/j de DBP mais jamais avec le DINP - <b>49-50 jpp</b> : ↘ du poids des muscles releveurs de l'anus et bulbo-caverneux avec DiNP à 750 mg/kg/j et DBP à 500 mg/kg/j	
<b>Adansonl et al. Reprod toxicol 28:66-74</b>	2009	DINP CAS #non précisé	gavage	0, 250 ou 750 mg/kg/j	de 12,5 à 17,5 jpc	Sprague Dawley	19,5 jpc	<b>1) toxicité générale / maternelle :</b> Poids des fœtus mâles augmenté pour 250 mais pas pour 750 mg/kg/j <b>2) Reprotoxicité</b> - ↗ concentration des mRNA de P450scs avec 750 mg/kg/j mais pas avec 250 mg/kg/j. En revanche l'expression protéique de P450scs n'est pas modifiée quelque soit la dose. - ↗ concentration de mRNA de l'Insl3 avec 750 mg/kg/j mais pas avec 250 mg/kg/j. - ↗ concentration de mRNA de GATA-4 avec 750 mg/kg/j mais pas avec 250 mg/kg/j.	<b>250 mg/kg/j / 750 mg/kg/j</b>

Auteur	Année	Phtalates étudiés	voie d'exposition	Doses	Période d'exposition	Espèce utilisée	Age à l'analyse	Effets observés	NOAEL / LOAEL
<b>Borch et al. Reprod toxicol 18:53-61</b>	2004	DiNP CAS# 28553-12-0 DEHP CAS# 117-81-7	gavage	0 ou 750 mg/kg/j de DINP ou 300 mg/kg/j de DEHP ou DINP750+ DEHP300	de 6,5 à 20,5 jpc	Sprague Dawley	20,5 jpc	<b>Reprotoxicité</b> - la réduction de la production testiculaire de testostérone est de même importance après traitement par DINP 750 et DEHP 300. - Effet cumulatif de DINP750 et de DEHP 300.	
<b>Gray et al. Reprod toxicol 58:350-365</b>	2011	DEHP (CAS#117-81-7) BBP (Benzyl-butyl-phthalate) (CAS#85-68-7) DINP (Di-isobutyl-phthalate) (CAS#68515-48-0) DEP (Di-Ethyl-phthalate) (CAS#84-66-2) DMP (Di-Methyl-phthalate) (CAS#131-11-3) DOTP ou DEHT (Diocetyl terephthalate ou Di-ethyl-hexyl-terephthalate (CAS#6422-86-2).	gavage	0, 750 mg/kg/jour	11,5 jpc à 2 jpp	Sprague Dawley	1jpp, 12jpp, 28 à 110 jpp	<b>Reprotoxicité</b> - <b>2 jpp</b> : seuls le BBP et le DEHP provoquent $\searrow$ du poids du testicule, $\searrow$ DAG, gonocytes multinuclés. - <b>12 jpp</b> : Maintien des mamelons avec BBP (70%), DEHP (87%) et aussi avec DiNP ( 22%) - <b>28-110 jpp</b> : Malformations de l'appareil reproducteur (testis, épидидyme, prostate... ) dans 84% pour BBP, 82% pour DEHP , 8% pour DiNP et 0% pour les autres.	<b>Si le toxic équivalent factor (TEF) du DEHP est égal à 1 alors, BBP : 1 DINP:0,05 - 0,1 DEP:0 DMP:0 DEHT:0</b>
<b>Sallenfait et al. Toxicol letters 18:53-61</b>	2006	DIBP CAS#84-69-5	gavage	0, 250, 500, 750, 1000 mg/kg/j	6,5 à 20,5 jpc	Sprague Dawley	21,5 jpc	<b>1) Embryotoxicité</b> $\searrow$ poids de l'utérus gravide, $\searrow$ du poids fœtal pour DIBP 500, 750, 1000 mg/kg/j. <b>2) Effets tératogènes</b> : malformations viscérales (anophtalmie, défauts aortiques, hernie du diaphragme, agénésie ou hypodéveloppement rénal) et squeletiques (retard de l'ossification des vertèbres, côtes surnuméraires) pour DIBP 750 et 1000 mg/kg/j. <b>3) Reprotoxicité</b> : retard dans la migration transabdominale des testicules dans les groupes	<b>250 mg/kg/j/ 500 mg/kg/j.</b>

Auteur	Année	Phtalates étudiés	voie d'exposition	Doses	Période d'exposition	Espèce utilisée	Age à l'analyse	Effets observés	NOAEL / LOAEL
								500 et 750 mg/kg/j.	
Sallenfait et al. <i>Reprod toxicol</i> 32:268-276	2011	DHPP (Di-n-heptyl phtalate CAS#3648-21-3) DnOP (Di-n-octyl phtalate CAS#117-84-0)	gavage	0, 250, 500, 750, 1000 mg/kg/j	6,5 à 20,5 jpc	Sprague Dawley	21,5 jpc	<p><b>1) Toxicité générale :</b> le poids corporel de la mère, le nombre et le poids des foetus vivants ne sont pas modifiés</p> <p><b>2) Effets métaboliques :</b></p> <p>a) Augmentation des transaminases hépatiques avec DHPP1000 et DnOP500 mg/kg/j.</p> <p>b) Augmentation du poids du foie avec DHPP ou DnOP 1000 mg/kg/j.</p> <p><b>3) Reprotoxicité et développement :</b></p> <p>a) <math>\searrow</math> DAG est chez les mâles avec 1000 mg/kg/j de DHPP mais pas avec le DnOP.</p> <p>b) <math>\searrow</math> nombre de phalanges proximales avec 500 DHPP et 1000 DnOP.</p> <p>c) <b>Présence d'une côte lombaire surnuméraire dès 250 mg/kg/j de DHPP ou de DnOP</b></p>	<b>NOAEL non déterminé car la plus faible dose testée (250 mg/kg/) est efficace</b>
Hannas et al. <i>Toxicol Sci</i> 120:184-193	2011	DPeP CAS#131-18-0	gavage	- gavage unique à GD17 : 0, 300, 600, 900 et 1200 mg/kg - gavage quotidien : 0, 11, 33, 100, 300 mg/kg/j	1) Unique à GD17 (17,5 jpc) 2) Chronique GD14-18 3) Chronique GD8-18	Sprague Dawley	GD17 ou GD18 PND 2 (=1jpp)	<p><b>1) Toxicité générale</b></p> <p>Le poids corporel de la mère, le poids des foetus vivants ne sont pas modifiés</p> <p>Mais <math>\searrow</math> nombre de nouveaux-nés après gavages chroniques: <math>\searrow</math> de moitié du nombre de nouveau nés avec un gavage de GD8 à G18. par100 mg/kg/j de DPeP (NOAEL=33 mg/kg/j, LOAEL= 100 mg/kg/j, ED 50 = 294 mg/kg/j)</p> <p><b>2) Effets antiandrogéniques sur le testicule foetal :</b></p> <p>gavage de G14 à G18 et observations à G18</p> <p><b>a) Réduction de la production testiculaire de testostérone à G18 (NOAEL = 11 ; LOAEL = 33 et ED50 = 48 mg/kg/j)</b></p> <p>b) Réduction de l'expression de marqueurs leydiens, StAR, Cyp11a, insl3 (NOAEL = 33 à 100 ; LOAEL = 100 à 300 et ED50 = 46 à 143 mg/kg/j).</p> <p><b>3) Effets antiandrogéniques sur le développement :</b></p>	<b>11 mg/kg/j/ 33 mg/kg/j.</b> (ED50=46 mg/kg/j)

Auteur	Année	Phtalates étudiés	voie d'exposition	Doses	Période d'exposition	Espèce utilisée	Age à l'analyse	Effets observés	NOAEL / LOAEL
								gavage de G14 à G18 ou de G8 à G18 a) à PND 2 ∩ DAG est chez les mâles (gavage GD14-18 : NOAEL = 33 ; LOAEL = 100 et ED50 = 257 mg/kg/j ; gavage GD8-18 : NOAEL = 100; LOAEL = 300 et ED50 = 253 mg/kg/j) b) à PND13 rétention des mamelons (NOAEL = 100; LOAEL = 300 et ED50 = 175 mg/kg/j).	
<b>Desdoits-Lethimonier et al. Human Reprod 27:1451-1459</b>	2012	DEHP et MEHP CAS#non précisé	<i>in vitro</i> : 1) culture d'une lignée surrénalienn e humaine (NCI-H295R) 2) culture de testicules d'hommes âgés	10-6 à 10-4 MEHP ou DEHP	1) lignée: culture pendant 3 jours. 2) explants testiculaires : culture pendant 2 jours	espèce humaine	Adulte	<b>1) Bioconversion</b> Les explants testiculaires ont une capacité de métaboliser le DEHP. Les valeurs maximales de formation de MEHP et de 5OH-MEHP in vitro sont de 78±27nmol/24h/g tissu et 58±8nmol/ 24h/g tissu respectivement. Cela conduit à une concentration finale de 3,9x10-5 M de MEHP et 2,9x10-5 M de 5OH-MEHP après 24h de culture (culture dans 2 ml de milieu). <b>2) Absence d'effets</b> Dans les explants testiculaires : - pas d'augmentation de l'apoptose des cellules germinales en réponse à 10-5 M de DEHP ou à 10-5 M de MEHP. - pas d'effet de 10-4 M de DEHP ou à 10-4 M de MEHP sur la sécrétion leydigienne d'INSL3 et sur la sécrétion sertolienne d'inhibine B. <b>3)Effets antiandrogéniques sur le testicule adulte</b> - 10-5M de MEHP ou de DEHP réduit la production de testostérone de la lignée NCI-H295R et des explants - l'effet inhibiteur est transitoire et disparaît au 3è jour de culture pour le MEHP dans la lignée et au 2è jour pour le MEHP et le DEHP dans les cultures d'explants testiculaires. - 10-4M de DEHP n'a pas d'effet dans les explants	<b>10-6 M / 10-5M</b>

Auteur	Année	Phtalates étudiés	voie d'exposition	Doses	Période d'exposition	Espèce utilisée	Age à l'analyse	Effets observés	NOAEL / LOAEL
								alors que 10-5M est efficace. - l'effet de 10-5M de MEHP est le même que celui de 10-4M (-30% environ) dans les explants testiculaires.	

Tableau 15: Tableau récapitulatif des données expérimentales sur le système reproducteur mâle

Auteur	Phtalates étudiés	Doses	Période d'exposition	Espèce utilisé	Période d'analyse	Effets observés	NOAEL	Remarques
Saillenfait <i>et al.</i> , 2013	di-n-hexyl phthalate (DnHP) / DEHP	1/ DEHP=625 mg/kg/j, et DnHP=125, 250, 500 or 625 mg/kg/j ; 2/ DEHP=50 mg/kg/j, et DnHP=5, 20, 50 or 100 mg/kg/j	GD 12- GD 19	SD	GD 19	<p>↘ testo ex vivo dès 20 mg/kg/j DnHP (+ d'effet que le DEHP)</p> <p>Expression des gènes testis : ↘SR-B1 (20), ↘ StAR, P450ssc, P450C17 (50) et 3βHSD (100)</p> <p>Immunohisto : agrégat des cell de Leydig, ↘nbre de cell de Leydig, cel germ au centre et cell de Sertoli à la périh, 500.</p>	5 mg/kg/j	



Auteur	Phtalates étudiés	Doses	Période d'exposition	Espèce utilisé	Période d'analyse	Effets observés	NOAEL	Remarques
Ahbab et al., 2013	DnHP / DhCP	0, 20, 100 et 500 mg/kg/j	GD 6-GD 19	Wistar	PND 20, PND 32 et PND 90	<p>Poids relatifs des différents organes :</p> <p><b>Prépubertaire</b> : ↘ testis DHP 100 ; ↗ DHP 100 ;</p> <p><b>Pubertaire</b> : ↘ testis DHP 100 ; ↘ épидидyme DHP 100 et 500 ; ↗ prostate DHP 500 ; ↘ VS DHP 500 ; <b>Adulte</b> : ↘ testis DHP 20</p> <p><u>Dosages hormonaux :</u></p> <p><b>Prepub</b> : ↗ Testo 100DHP ; AMH ↗ 20 DHP ; Inh B ↘ 20 et 500 DHP, 20 et 500 DHP ; FSH : RAS</p> <p><b>Pub</b> : Testo ↘ 20 et 500 DHP et 20 et 500 DHP ; AMH ↘ 20 DHP ; InhB ; ↘ 500 DHP ; FSH ↗ pub. 20, 100 et 500 DHP et 20 et 100 DHP</p> <p><b>Adulte</b> : Testo RAS ; AMH ↗ 100 et 500 DHP ; InhB ↘ 100 et 500 DHP ; FSH RAS</p> <p><u>Histologie:</u></p> <p><b>Prépub.</b> ↗ atrophie des tubules, ↗ débris de cell germ, ↗ cell picnotiques ts les gpes; <b>Pub.</b> ↗ anomalies 500 DHP et ts les DHP; <b>Adulte.</b> atrophie tubulaire 100 et 500DHP+ vacuolisation cell de Sertoli 500 DHP et ts les DHP</p> <p>Réserve spermatique:RAS</p> <p><u>Morphologie des spz:</u> ↘ % FT ts les gpes, tête: 500 DHP et 100 DHP, PI: 100 DHP et flagelle: tous sauf 100 DHP</p> <p><u>Mesures histo:</u></p> <p>Tubules séminifères : diamètre ↗20 DHP, ↘500 DHP; 20, 100, 500 DHP; diamètre lum ↗20 DHP, ↘ 20, 100 DHP; épaisseur de l'épithélium: ↘ 20 DHP</p> <p>Tubules épидидymaire : diamètre ↗20 DHP, ↘500 DHP; 20, 100 DHP; diamètre lum ↘ 500 DHP, 20, 100 DHP; épaisseur de l'épithélium: RAS</p>	LOAEL : 20 DnHP; 20 DHP	Prépub = 20???; pub = 32??? ; Analyse histo

Auteur	Phtalates étudiés	Doses	Période d'exposition	Espèce utilisé	Période d'analyse	Effets observés	NOAEL	Remarques
Saillenfait <i>et al.</i> , 2013	diundecyl and ditridecyl phthalates (DUDP/DTDP)	0, 0.25, 0.5, or 1 g/kg/j	GD 6- GD 20	SD	GD 21	<p><b>DUDP</b> : Pas de modifications du poids des femelles gestantes et des gains de poids Pas de modification du nombre de corps jaunes, de l'incidence des pertes préimplantatoires et des pertes postimplantatoires, résorptions de fœtus vivants, sur le sexe ratio. AGD non modifiée de manière significative. A noter, <b>une diminution statistiquement significative a été noté à 0,5 g / kg, après ajustement avec la racine cubique de poids du fœtus</b> Pas d'effets sur la descente testiculaire.</p> <p><b>DTDP</b> : pas d'effets significatifs</p>	DUDP et DTDP : NOAEL : 1g/kg/j DUDP : LOAEL : 0,5/kg/j AGD relative	
Saillenfait <i>et al.</i> , 2011	di-n-propyl phthalate (DnPP)	0; 0,5; 1 et 1,5 g/kg/j	GD 6- GD 20	SD	GD 21	<p>Consommation alimentaire : RAS ; P utérus gravide : RAS ; ↘ gain de poids en début de gestation pour DnPP 1,5 ; ↗ALAT pour DnPP 1 et 1,5 ; ↗PR Foie pour DnPP 1 et 1,5</p> <p>Fœtus : ↘ poids (M+F) pour DnPP 1,5 ; ↘ DAG chez le mâle pour DnPP 1 et 1,5 ; idem pour la R-DAG ; ↗ R-DAG chez les femelles pour DnPP 1,5 Anomalies du squelette, DnPP 1 et 1,5 RAS descente testiculaire</p>	NOAEL toxicité développementale =0,5g/kg/j	
Saillenfait <i>et al.</i> , 2013	diisooctyl phthalate (DIOP)	0, 0.1, 0.5, 1 g/kg/j	GD 6- GD 20	SD	GD 21	↗ pertes postimplantatoire + résorptions à 1 g/kg/j ; ↘ poids des fœtus à 0,5 et 1 g/kg/j ; testis non descendu à 1 g/kg/j; anomalies osseuses (retard d'ossification) à 0,5 et 1 g/kg/j	0,1	
		0, 0.01, 0.1, 0.5, 1 g/kg/j	GD 12-19		GD 19	Production ex vivo de la testostérone fœtal: ↘ dès 0,1 g/kg/j	0,01	
		0, 0.1, 0.5, 1 g/kg/j	GD 12-GD 21,		PND 21-22; PND 68-71; PND 82-	Anomalies du système reproductif mâle : hypospadias, testis non descendus, ↘ poids (et PR) des testis et epididyme, et anomalies histo avec "hypospermatogenèse" pour le groupe 1g/kg/j	0,5	

Auteur	Phtalates étudiés	Doses	Période d'exposition	Espèce utilisé	Période d'analyse	Effets observés	NOAEL	Remarques
					84			
Mc Kee et al., 2008	di-isoheptyl phthalate (DIHP)	0; 100; 300 et 750 mg/kg/j	GD 6- GD 20	SD VAF/Plus	GD 21	↘ poids utérin, ↗ PPI et résorptions et ↘ poids des fœtus pour le gpe 750	NOAEL = 300	exxonMobil
		0, 1000 ppm, 4500 ppm et 8000 ppm	Reprotox sur 2G; OECD 416		chronique sur 2G	8000ppm :		
Saillenfait et al., 2008	Diallyl phthalate (DAP)	0, 100, 150, 200, and 250 mg/kg/j	GD 6- GD 20	SD	GD 21	↘ Prise de poids durant la gestation 200 et 250 + ↘ prise alimentaire; ↘ poids de l'utérus gravide (250) Pas d'effet sur le nombre de sites d'implantation, de pertes post implantatoires, de fœtus vivants ... ↘ poids des fœtus (200 et 250), mâle ou femelle. Retard d'ossification DAP 250, anomalies du squelette DAP 200 et 250	NOAEL Toxicité hépatique : 100 mg/kg/j Toxicité maternelle et fœtale : 150 mg/kg/j	

Auteur	Phtalates étudiés	Doses	Période d'exposition	Espèce utilisé	Période d'analyse	Effets observés	NOAEL	Remarques
Saillenfait <i>et al.</i> , 2008	Diisobutyl phthalate (DIBP) Di-n-butyl phthalate (DBP)	DBP 500mg/kg ; DIBP: 0, 125, 250, 500, or 625 mg/kg/j	GD 12-21	SD	J21 ; J76-86 ; J111-122	<p>DIBP : Pas d'effets sur les paramètres reproductifs : poids des femelles pdt la gestation, durée de la gestation, perte post-implantatoire, taille des portées, sexe ratio. Diminution du poids des mâles à J1 et J21</p> <p>DIBP 625</p> <p>DBP : ∩ poids des femelles ; survie des petits ; diminution du poids des mâles à J1 ; 14 et 21</p> <p>Diminution du poids des mâles à J1 DIBP 625 et DBP</p> <p>DAG ∩ DIBP 250 ; 500 ; 625 et DBP ; ajustement au poids ? a priori fait mais non vu</p> <p>Séparation du prépuce retardé DIBP 500 (4j)</p> <p>↗ Malformations génitales (hypospadias, testicules non descendus, malformations du prépuce...) DIBP 500 et 625, et DBP</p> <p>Adulte : ∩ poids testis, epididyme, VS et prostate DIBP (+/- covariable poids). Incidence augmentée de non descente testiculaire liée à la diminution du poids.</p> <p>Histopath :</p> <p>Epididyme : azoo et oligo (définition, comment rat ???), altération testiculaire avec des nécroses, hyperplasie ...</p> <p>DIBP 500 et DBP (manque de précision)</p>		

## **Discussion : Peut-on évaluer le risque sanitaire des phtalates à partir de leur pouvoir antiandrogénique chez le fœtus mâle ?**

Dans le domaine de la reproduction masculine, l'augmentation de l'incidence de plusieurs anomalies suscite des inquiétudes. Bien qu'il existe des différences régionales, la production spermatique a nettement diminué au cours de dernières décennies alors que les incidences de la cryptorchidie et de l'hypospadias ont augmenté (*revues dans Sharpe & Irvine 2004, Leridon & Slama 2008*). De plus, toutes les études convergent pour montrer que l'incidence du cancer du testicule a augmenté de façon régulière au cours des dernières décades. Les perturbateurs endocriniens sont incriminés dans ces dégradations de la fonction reproductive masculine (*revues dans Adamo et al. 2011*). L'hypothèse la plus couramment admise est que ces altérations résulteraient d'anomalies du développement du testicule pendant la vie fœtale et néonatale (*Skakkebaek et al. 2001, revues dans Delbes et al. 2006, Sharpe & Skakkebaek 2008, Scott et al. 2009, Habert et al. 2009, Main et al. 2010, Toppari et al. 2010, Martinez-Arguelles et al. 2013*). Le testicule fœtal et néonatal apparaît donc comme une cible privilégiée des perturbateurs endocriniens. D'autre part, un même traitement par un perturbateur endocrinien altère plus profondément les fonctions de reproduction adulte lorsque ce traitement est effectué pendant la vie fœtale que lorsqu'il a lieu pendant la puberté ou à l'âge adulte (*Wine et al. 1997, Mylchreest et al. 2000, Gray et al. 2000; Parks et al. 2000, Higuchi et al. 2003, Mahood et al. 2007, review in Ge et al. 2007*). Ainsi, beaucoup d'évaluation du risque sanitaire (ERS) sont fondées sur la recherche des conséquences d'une exposition fœtale et/ou néonatale sur les fonctions de reproduction masculine. C'est le cas en particulier des phtalates.

Des centaines de publications ont montré que certains phtalates altèrent la production de testostérone par le testicule chez le fœtus de rat et cet effet anti-androgénique est couramment utilisé pour l'ERS des phtalates. Cependant, plusieurs données récentes vont dans le sens d'une absence d'effet antiandrogénique des phtalates sur le testicule foetal dans l'espèce humaine (*revues dans Habert et al. 2009, Scott et al. 2009, Johnson et al. 2012, Albert & Jégou 2013, Veeramachaneni & Klinefelter 2013*). Après avoir rappelé les effets des phtalates sur les fonctions des cellules de Leydig foetales chez le rat, nous comparerons dans ce rapport ces données avec celles obtenues dans l'espèce humaine, puis nous étendrons l'analyse à d'autres espèces.

### **Effets des phtalates chez le fœtus de rat**

Une littérature très abondante et convergente montre que certains phtalates tels que le diéthylhexyl phtalate (DEHP), le dibutyl phtalate (DBP), butylbenzyl phtalate (BBP), diisononyl phtalate (DINP), diisoheptyl phtalate (DIHP) et le dipentyl phtalate (DPeP) ont la

potentialité d'altérer les fonctions et/ou du développement des cellules de Leydig foetales et, par conséquent, la masculinisation du fœtus chez le rat.

### **Altération du développement et des fonctions des cellules de Leydig foetales**

La cellule de Leydig foétale est un type cellulaire particulier qui a des caractéristiques morphologiques, moléculaires et fonctionnelles différents de celles des cellules de Leydig adultes qui, elles, ne se différencieront qu'à la puberté. Chez le rat, les premières cellules de Leydig foetales se différencient à 15 jours post conception (jpc) et l'activité stéroïdogène du testicule foetal est maximum à 18,5 jpc (*i.e.* 3 jours avant la naissance). Puis les cellules de Leydig régressent fonctionnellement au cours des deux premières semaines de vie postnatale (*revues dans Habert et al. 2001, Scott et al. 2009, O'Shaughnessy & Fowler 2011*).

L'administration de phtalates à des rates pendant la dernière semaine de gestation provoque des altérations morphologiques, moléculaires et fonctionnelles des cellules de Leydig foetales (*revues dans Scott et al. 2009, Habert et al. 2009, Svechnikov K et al. 2010, Albert & Jégou, 2013, Martinez-Arguelles et al. 2013*). Les phtalates provoquent une accélération de l'agrégation des cellules de Leydig, l'apparition de cellules de Leydig au sein de l'épithélium séminifère (*Barlow & Foster 2003; Mahood et al. 2005*) une modification de la taille (mais pas du nombre) des cellules de Leydig et une réduction dose-dépendante de la production testiculaire de testostérone (*Fisher et al. 2003, Lehmann et al. 2004, Mahood et al. 2005, Mahood et al. 2007, Howdeshell et al. 2008*). La production testiculaire de testostérone est très fortement réduite. Ceci résulte d'une diminution de l'expression testiculaire de plusieurs gènes clés impliqués dans le transport et le métabolisme du cholestérol (*Star, HMG-CoA synthase et Srb1*) et ou dans la synthèse de testostérone (*Cyp11a, 3beta-Hsd et Cyp17*) (*Thompson et al. 2004, Borch et al. 2006, Culty et al. 2008*). Sharpe et coll. ont récemment émis l'hypothèse que ces modifications résulteraient d'un maintien de l'expression de COUP TFII, un inhibiteur compétitif de SF-I nécessaire à la différenciation des cellules de Leydig (*van den Driesche et al. 2012*).

Les cellules de Leydig foetales produisent une autre hormone, l'insulin like 3 (Insl 3). Cette protéine impose la descente transabdominale des testicules fœtaux depuis leur position initiale sur le rein embryonnaire (le mesonephros) jusqu'à l'entrée du canal inguinal alors que la descente inguino-scrotale des testicules est androgéno-dépendante. L'exposition à certains phtalates réduit également l'expression de l'Insl3 par le testicule foetal de rat (*Wilson et al. 2004, McKinnel et al. 2005*).

### **Altération de la masculinisation du fœtus et du nouveau-né**

La réduction de l'activité des cellules de Leydig foetales à des conséquences sur la

masculinisation du fœtus et du nouveau-né qui servent de critères macroscopiques dans l'ERS des phtalates (*revues dans Foster et al. 2001, Gray et al. 2006, Foster 2006, Struve et al. 2009, Scott et al. 2009*). Chez le fœtus mâle, ce sont les androgènes testiculaires qui imposent la différenciation du canal de Wolff en épидидyme, canal déférent et vésicule séminale. Le sinus urogénital donne naissance à la prostate et aux glandes bulbo-urétrales et le tubercule urogénital au scrotum et au pénis. Chez le fœtus femelle, en l'absence d'androgènes, le canal de Wolff disparaît, le sinus urogénital forme la partie inférieure du vagin alors que le tubercule urogénital forme les petites et les grandes lèvres. Les trompes de Fallope, l'utérus et la partie supérieure du vagin dérivent spontanément des canaux de Müller en l'absence de toute stimulation hormonale. Chez le mâle, les cellules de Sertoli sécrètent une hormone, l'hormone anti-müllérienne (AMH) qui impose la régression des canaux de Müller. On parle alors de déféminisation (*Jost et al. 1973*).

Chez le rat, la masculinisation des organes génitaux internes et externes débute à 18,5 jpc et beaucoup d'études se sont concentrées sur la fin de la vie fœtale (*i.e.* de 18,5 à 21,5 jpc). En fait, il a été montré au cours des dernières années que la période de masculinisation androgéno-dépendante précède la différenciation morphologique des structures (*Welsh et al. 2008, Macleod et al. 2010*). En effet, une réduction de la production ou de l'action de la testostérone entre 15,5 à 18,5 jpc, c'est-à-dire au début de l'activité stéroïdogène du testicule fœtal, provoquent des défauts de masculinisation observés à la naissance : défauts de formation du pénis (hypospadias), cryptorchidie, hypodéveloppement ou agénésie de la prostate et des vésicules séminales, réduction de la distance ano-génitale (DAG) et de la longueur du pénis. La formation et la taille des organes génitaux sont donc prédéterminées pendant la période 15,5-18,5 jpc et cette période a été appelée la « masculinization programming window ». Une réduction des androgènes après cette période, pendant la vie fœtale et néonatale n'affecte pas l'ontogenèse des organes génitaux, mais elle réduit néanmoins leur taille ainsi que celle de la DAG.

Il est clairement acquis que l'exposition aux phtalates pendant la vie fœtale induit de nombreux défauts ou insuffisances de la masculinisation chez le rat (*revues dans Gray et al. 2001, Fisher 2004, Foster 2006, Toppari et al. 2006, Ge et al. 2007, Sharpe & Skakkebaek 2008, Hu et al. 2009, Habert et al. 2009, Scott et al. 2009, Svechnikov K et al. 2010*). A la naissance, on observe une augmentation de la fréquence de l'hypospadias, de la cryptorchidie, des lésions du gubernaculum des malformations ou une réduction du poids de l'épididyme, des vésicules séminales, des canaux déférents, de la prostate ou des muscles releveur de l'anus et bulbo-caverneux et, enfin, une diminution de la DAG. Chez le rat mâle, sous l'influence des androgènes, les mamelons disparaissent normalement à 12 jours *post partum* (jpp) mais, après traitement par les phtalates, on observe un maintien des mamelons. Tous ces défauts,

facilement mesurables, sont de « endpoints » classiques pour définir les NOAEL/LOAEL des différents phtalates. Ainsi, le LOAEL du DEHP a-t-il été établi à 3 mg/j/kg par la mesure de la DAG à 2 jpp après une exposition de 15,5 à 21,5 jpc (*Lee et al. 2004*), à 11 mg/kg/j (la plus faible dose utilisée) par l'évaluation de divers malformations des organes reproducteurs à l'âge adulte après une exposition de 8,5 jpc à 17 jpp (*Gray et al. 2009*) ou à 10 mg/kg/j par la mesure de la DAG à la naissance ou l'observation de la rétention des mamelons à 12 jpp après une exposition *in utero* de 7,5 à 16,5 jpc (*Christiansen et al. 2010*).

### **Effets des phtalates chez le fœtus humain**

Malgré le nombre important d'études sur la toxicité des phtalates dans les modèles animaux nous disposons en fait de très peu d'informations concernant leurs effets sur le développement de la fonction reproductive chez l'homme (*revues dans Habert et al. 2009, Scott et al. 2009, Adamo et al. 2011, Johnson et al. 2012, Albert & Jégou, 2013, Veeramachaneni & Klinefelter 2013*).

### **Etudes épidémiologiques**

Actuellement six études ont recherché une corrélation entre l'exposition de la femme enceinte ou du nourrisson aux phtalates et une réduction de l'activité androgénique du testicule foetal ou néonatal évalué par la DAG (*Swann et al. 2005, Swann 2008, Bustamente-Montes et al. 2008, Huang et al. 2009, Suzuki et al. 2012*), la taille du pénis (*Swann 2008, Bustamente-Montes et al. 2008*) et l'incidence de l'hypospadias (*Ommond et al. 2009*). Les résultats ne sont pas convergents et Luc Multigner et Patrick Thonneau dans ce GTPE ont estimé que la solidité de ces études n'est pas suffisante pour conclure à une association entre exposition aux phtalates et réduction de l'activité androgène du testicule foetal chez l'Homme.

### **Etudes expérimentales**

Les études expérimentales concernant l'effet des phtalates sur le testicule foetal humain sont actuellement limitées à 7 articles. Cinq de ces articles issus de 3 équipes différentes (Boekelheide, Habert et Sharpe) ont recherché sans succès un effet antiandrogène du DBP ou du DEHP en utilisant des modèles de culture organotypique ou de xénogreffe.

### **Etudes in vitro**

Une première étude a été conduite par le groupe de Richard Sharpe (*Hallmark et al. 2007*). Des testicules foetaux, issus d'IMG entre 15 et 19 semaines de grossesse (SG), ont été fragmentés en plusieurs morceaux. Un même nombre de fragments testiculaires a été mis en culture sur filtres immergés dans différents puits pendant 24h en présence ou en absence de  $10^{-3}$  M de MBP. La production de testostérone dans le milieu basal, ou en présence d'hCG ou de 22R-hydroxycholestérol, n'est pas modifiée par l'addition du DBP. L'absence



d'effet observée ici, impliquait un témoin positif. Les auteurs utilisent alors des testicules fœtaux de rat à 19,5 jpc dont ils avaient démontré que la production de testostérone est réduite *in vivo* par un gavage de la mère par 500 mg/kg/j de DBP. Ils choisissent 19,5 jpc car c'est un stade de développement leydigien comparable à 15-19 SG de l'espèce humaine puisque la production testiculaire de testostérone est maximum à 14 SG dans l'espèce humaine et à 18,5 jpc chez le rat. L'addition de  $10^{-3}$  M de MBP dans le milieu de culture ne modifie pas significativement la sécrétion *in vitro* de testostérone par les explants testiculaires de rat en condition basale ou stimulée par le 22R-hydroxycholestérol. En revanche, la production de testostérone stimulée par l'hCG est réduite de moitié par le MBP. Les auteurs concluent que le système *in vitro* ne permet pas d'observer l'effet antiandrogénique des phtalates, et que ceci explique l'absence d'effet observé chez l'humain. L'interprétation du rapporteur est différente. Les auteurs ont réuni dans un même puits de culture plusieurs fragments testiculaires issus de différents fœtus de rat. Cette méthodologie aboutit à une grande variabilité de la quantité de testostérone sécrétée dans chaque puits qui doit masquer l'effet du MBP sur la production de testostérone dans les conditions basales ou stimulées par le 22R-hydroxycholestérol. D'ailleurs les auteurs notent cette grande variabilité.

Une perturbation des fonctions leydigiennes en réponse aux phtalates a également été recherchée dans le testicule fœtal humain (Lambrot *et al.* 2009). Les analyses ont été effectuées selon un protocole de culture organotypique mis au point dans l'équipe et appelé Fetal Testis Assay (FeTA) (Habert *et al.* 1991, Lecerf *et al.* 1993, Lambrot *et al.* 2006). Les fragments testiculaires sont cultivés sur un insert à l'interface air-milieu ce qui assure le développement de tous les types cellulaires du testicule. Les testicules fœtaux sont issus d'IVG entre 7 et 12 semaines de grossesse. Cette période est équivalente à 15,5-17,5 jpc chez le rat et correspond à la « Masculizing Programming Window » (si une telle fenêtre existe dans l'espèce humaine). Tous les fragments issus d'un même testicule sont cultivés en présence de  $10^{-4}$  M à  $10^{-6}$  M de MEHP pendant 3 jours avec changement quotidien du milieu de culture. Tous les fragments issus de l'autre testicule du même fœtus sont cultivés en l'absence de MEHP et servent de témoin. Ceci permet des tests statistiques en valeurs appariées. L'addition de MEHP au milieu de culture ne modifie ni la sécrétion quotidienne de testostérone en condition basale ou stimulée par LH, ni l'expression des gènes clés impliqués dans la biosynthèse de testostérone (*StAR*, *CYP11A* et *CYP17*). De même, l'expression de *INSL3* n'est pas affectée par le MEHP. Plusieurs contrôles tendent à valider ces résultats.

- Dans les mêmes explants testiculaires, les autres types cellulaires sont affectés par le traitement par le MEHP. Une concentration de  $10^{-4}$  M de MEHP provoque une réduction de 40% du nombre de cellules germinales et une réduction de 50% du taux d'ARNm de

l'AMH des cellules de Sertoli. L'effet apoptotique du MEHP sur les gonocytes humains est statistiquement significatif dès  $10^{-5}$  M (*Muczynski et al. 2012a*).

- Dans ce même système *in vitro*, les cellules de Leydig fœtales humaines sont sensibles aux perturbateurs endocriniens comme le montre le fait qu'une concentration aussi faible que  $10^{-8}$  M de bisphénol A réduit la production de testostérone et l'expression de l'*INSL3* (*N'Tumba-Byn et al. 2013*).
- Dans ce même système *in vitro*, le MEHP stimule l'expression de *LXRalpha* et des gènes LXR alpha-dépendants (*SREBP1*, *SREBP2* et certains gènes de la voie de biosynthèse du cholestérol et des lipides (*Muczynski et al. 2012b*).
- Dans ce même système *in vitro*  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  M de MEHP réduisent la production de testostérone des testicules de fœtaux de rat explantés à un stade développemental comparable (14,5 jpc) et cultivés pendant 3 jours (*Habert et al. soumis*). Ce résultat est partiellement en opposition avec un travail de l'équipe de B. Jégou qui utilise notre système de culture organotypique. Cette équipe n'observe pas de modification de la production de testostérone des testicules fœtaux de rat en réponse au MEHP. Cependant, en changeant seulement la moitié du milieu de culture quotidiennement l'effet anti-androgénique du MEHP est observé (*Chauvigné et al. 2009*).

En conclusion, bien que l'expérimentation *in vitro* ait ses propres limites (absence de vascularisation, durée de survie limitée...), elle permet d'évaluer directement l'effet à court terme d'un toxique sur les fonctions du testicule fœtal (*Lambrot et al. 2006*). Même si toutes les études *in vitro* ne sont pas concordantes pour montrer un effet anti-androgénique des phtalates chez le rat l'utilisation d'un même système de culture par la même équipe a toujours montré un effet anti-androgénique chez le rat et pas chez l'humain.

#### 3.4.1.1.9 Etudes utilisant le modèle de xénogreffe

Trois études publiées en 2012 et 2013 issues de 2 équipes (Sharpe et Boekelheide) utilisent le modèle de greffe de testicules fœtaux humains chez des rongeurs.

L'équipe de Sharpe a initié cette approche expérimentale (*Mitchell et al. 2010*). Les testicules fœtaux humains sont issus d'IMG à 14-20 semaines de grossesse. Ils sont fragmentés en morceaux d'environ  $1 \text{ mm}^3$  qui sont greffés sous la peau de souris CD1 Nude préalablement castrées. Dans ce modèle, les différents types cellulaires du testicule fœtal maintiennent leur développement et/ou leur survie pendant 6 semaines. En particulier, la production de testostérone, évaluée directement par dosage dans le sang de la souris ou par la taille de ses vésicules séminales, est maintenue lorsque les souris greffées sont injectées régulièrement d'hCG. Ce test a été utilisé pour évaluer l'activité antiandrogénique des

phtalates (Mitchell et al. 2012). Dans cette étude, les souris sont sacrifiées 6 semaines après avoir été greffées et elles sont gavées par 500mg/kg/j de DBP, de MBP ou par le solvant pendant les 4 ou les 21 derniers jours avant le sacrifice. Le traitement par les phtalates ne modifie ni la testostéronémie ni le poids des vésicules séminales des souris hôtes. Comme témoin positif, ces auteurs observent un effet antiandrogénique du DBP sur le testicule foetal de rat greffé chez la souris. Les testicules sont issus de foetus de rat à 17,5 jpc, un stade développemental comparable au 2<sup>e</sup> trimestre de grossesse chez l'Homme. Les souris sont gavées par 500 mg/kg/j ou par le solvant comme précédemment mais, en raison de la rapidité du développement testiculaire chez le rat comparé à l'Homme, le gavage des souris hôtes commence dès le jour de la greffe et ne dure que 4 jours. Ce traitement induit une diminution significative du poids des vésicules séminales et une réduction non significative ( $p= 0,062$ ,  $n=6$ ) de la testostéronémie de la souris hôte. En outre, le DBP réduit significativement l'expression de *StAR* et de *Cyp11a1* du greffon.

L'équipe de Kim Boekelheide a d'abord utilisé un autre système de xéno greffe pour tester l'effet des phtalates sur les fonctions du testicule foetal humain (Heger et al. 2012). Les testicules humains issus d'avortements spontanés de 10 à 24 semaines de grossesse sont découpés en fragments d'environ 1 mm<sup>3</sup> qui sont greffés dans la capsule rénale de rats (CrI:NIH-Foxn1<sup>nu</sup>) nude adultes mâles non castrés. Vingt quatre heures après la greffe, les rats sont gavés par 0, 100, 250 ou 500 mg DBP/kg/j pendant 2 ou 3 jours puis sont sacrifiés 6 h après le dernier gavage. L'expression des gènes clés du métabolisme du cholestérol et de la stéroïdogénèse dans les greffons (*SCARB1*, *STAR*, *CYP11A1*, *CYP17A1*) n'est pas jamais modifiée par les traitements par le DBP. De même, l'expression de l'*INSL3* n'est pas statistiquement affectée malgré une forte diminution inexplicée pour la dose de 100 mg/kg/j. Plusieurs contrôles tendent à valider ces résultats. D'abord, les auteurs effectuent une analyse histologique des greffons qui montre une augmentation du nombre de gonocytes multinucléés en réponse à toutes les doses de DBP testées. Cependant, ce contrôle interne est fragilisé par le fait que les auteurs que cette augmentation n'est pas dose-dépendante. De même, les auteurs n'ont pas observé de modifications induites par le DBP dans la densité des gonocytes par unité de surface, même après trois jours de traitements alors qu'*in vitro* le nombre de gonocytes est fortement réduit par les phtalates (Lambrot et al. 2009). Les auteurs utilisent également l'effet anti-androgénique des phtalates sur le testicule foetal de rat comme contrôle positif. Des testicules de foetus de 16,5 jpc sont greffés chez des rats nude traités au DBP comme précédemment. Après deux jours d'exposition à 500 mg/kg/j de DBP, la capacité du greffon à produire de la testostérone *ex vivo* ainsi que les expressions de *Cyp17a1*, de *Scarb1* et de l'*Ins3* sont réduites de moitié.

L'équipe de Boekelheide a publié tout récemment (le 27 novembre) une nouvelle étude qui confirme la précédente (Spade et al. 2013). Les fragments testiculaires humains de 16 à 22

semaines post conception sont greffés dans la capsule rénale de souris Nude mâles préalablement castrées. Les souris greffées sont traitées à l'hCG pendant 4 semaines. Pendant les 2 dernières semaines elles sont gavées avec 500 mg/kg/j de DBP, 75 mg/kg/j d'acétate d'abiratérone (un inhibiteur de CYP17A1, une enzyme stéroïdogène) ou avec le solvant. La testostéronémie des souris greffées est considérablement réduite par le traitement à l'acétate d'abiratérone (- 80%) alors qu'elle n'est pas affectée par le DBP. De plus, certains paramètres physiologiques utilisés dans le test d'Hershberger (poids des vésicules séminales, de la prostate ventrale et du muscle bulbo caverneux élévateur de l'anus) sont réduits par l'acétate d'abiratérone mais pas par le DBP.

En conclusion, bien que le modèle de xénogreffe présente des limites (variabilité de la survie des greffons, réactions compensatrices de l'hôte...) ce modèle permet des analyses à long terme. Les trois articles décrits ci-dessus utilisent des protocoles différents et mesurent des paramètres différents mais ils convergent dans leur conclusion. Ils montrent que le modèle de xénogreffe ne met pas en évidence d'effet antiandrogénique des phtalates dans l'espèce humaine alors qu'il est apte à le montrer chez le rat.

### **Effets des phtalates chez les autres Mammifères**

Très peu d'études ont été conduites chez les autres Mammifères.

#### **Effet des phtalates chez le fœtus de lapin**

On ne dispose que d'une publication chez cette espèce (*Higuchi et al., 2003*). Des lapines gestantes ont été gavées par 400 mg de DBP/kg/j depuis le début de la formation du testicule fœtal (15 jpc) jusqu'à 3 jours avant la parturition (29 jpc). Avant la puberté (12 semaines *post partum*) et/ou à l'âge adulte (25 semaines *post partum*), les auteurs observent une réduction du poids du testicule et des glandes annexes et une diminution qualitative et quantitative des spermatozoïdes dans l'éjaculat. Le volume de l'éjaculat est également diminué. Ces altérations peuvent provenir d'une diminution de l'activité des cellules de Leydig foetales mais aussi d'un effet sur le compartiment séminifère ou sur le système hypothalamo-hypophysaire pendant la vie fœtale. Dans cette étude, la testostéronémie n'est mesurée qu'à partir de la fin de la période de lactation (6 semaines *post partum*) c'est-à-dire pendant la différenciation des cellules de Leydig adulte. Parmi les 17 mâles exposés *in utero*, un animal montrait une cryptorchidie et des organes génitaux externes fortement féminisés ce qui n'a jamais été observé chez les témoins. Ceci suggère que le DBP peut être antiandrogénique pendant la vie fœtale chez le lapin. Cependant, la fréquence des anomalies de la masculinisation du fœtus observée ici est beaucoup moins importante que celle rapportée chez le rat exposé aux phtalates *in utero* (revues dans *Foster et al. 2001, Scott et al. 2009, Svechnikov K et al. 2010*).

## Effet des phtalates chez le fœtus de souris

La capacité des phtalates à diminuer l'activité des cellules de Leydig fœtales chez la souris n'est pas démontrée.

Une première étude a été effectuée *in vivo* (Gaido *et al.* 2007). Après un gavage des souris gravides avec du DBP (1500 mg/kg/j) ou du MBP (1000 mg/kg/j) ou du MEHP (1000 mg/kg/j) de 14,5 à 16,5 ou de 15,5 à 17,5 jpc, le contenu du testicule fœtal en testostérone et en mRNA de *Scarb1* et de *Cyp11a1* n'est pas modifié à 17,5 jpc. En revanche, comme chez le rat, ces traitements induisent la formation de gonocytes multinucléés. L'administration d'une dose unique de 500 mg/kg/j de DBP à 18,5 jpc à 18,5 jpc ne réduit pas l'expression des principaux gènes du métabolisme et du transport du cholestérol (*Scarb1*, *Dhcr7*, *Star*) et de la biosynthèse de testostérone (*Cyp11a1*, *Cyp17*) évaluée 4 ou 8h après le gavage. Certains gènes sont même up-régulés. Avec un protocole similaire, les auteurs avaient montré précédemment que tous ces gènes étaient down-régulés par les phtalates chez le fœtus de rat (Thompson *et al.* 2004). Enfin, les auteurs notent que l'évolution temporelle de la concentration de MBP dans le plasma fœtal à la suite du gavage de la mère par le DBP est comparable chez le rat et la souris. Les auteurs concluent que, contrairement au rat, les phtalates n'affectent pas l'activité stéroïdogène du testicule fœtal chez la souris.

Une autre étude *in vivo* a abouti à des conclusions différentes. Dans un article par Liu *et al.* (2008), les souris sont traitées par 100, 200 ou 500 mg/kg/j de DEHP entre 12,5 et 17,5 jpc. Le traitement commence ainsi dès la différenciation des premières cellules de Leydig fœtales. A 19,5 jpc, jour de la naissance chez la souris, les auteurs observent une augmentation dose-dépendante de l'hypospadias ainsi qu'une diminution de la DAG pour la plus forte dose.

Dans un article par Do *et al.* (2012), les souris sont traitées de 9 à 18,5 jpc par 0, 0,0005, 0,001, 0,005, 0,5, 50 à 500 mg/kg/j de DEHP. Chez les fœtus mâles, la testostéronémie et le contenu testiculaire en testostérone et la DAG, évalués 2 à 4 h après le dernier gavage, sont augmentés selon une courbe dose-réponse en U inversé avec un maximum d'effet pour la dose de 0,05 mg/kg/j. En accord avec Gaido *et al.* (2007), la dose de 500mg/kg/j est sans effet.

Une étude *in vivo* s'intéresse à l'Insl3 (Song *et al.* 2008). Les souris sont gavées par 100, 200 ou 500 mg/kg/j de DEHP entre 12,5 jpc et 3 jpp. Ce traitement induit une diminution dose-dépendante de l'expression de l'Insl3 mesurée à 5 jpp. Cette diminution est statistiquement significative dès la plus faible dose utilisée.

Enfin une étude *in vitro* met en évidence la complexité du modèle souris et tend à réconcilier les données précédentes (Lehraiki et al. 2009). Les testicules fœtaux sont prélevés à 13,5 ou à 18,5 jpc et placés en culture organotypique pendant 3 jours à l'interface air-milieu selon un protocole identique à celui décrit ci-dessus pour les testicules fœtaux humains ou de rat (système FeTA) (Livera et al. 2006). Pour chaque fœtus un testicule est cultivé en présence de  $2.10^{-4}$  M de MEHP et l'autre testicule est cultivé en son absence et sert de témoin. Avec des testicules explantés à 13,5 jpc, la sécrétion basale de testostérone est augmentée par le MEHP au cours des 3 jours de culture. Avec les testicules explantés à 18,5 jpc, la sécrétion basale est également augmentée mais la sécrétion stimulée par LH est diminuée par le MEHP. Sachant que la sécrétion de LH apparaît physiologiquement à 17,5-18,5 jpc chez le fœtus de souris, cela explique que les effets antiandrogéniques des phtalates ne soient observés *in vivo* qu'en fin de vie fœtale ou en période néonatale et que les observations effectuées à des stades plus jeunes (17,5 ou 18,5 jpc) n'aient pas noté d'effet ou ont noté un effet positif.

### **Effet des phtalates chez le fœtus de Ouistiti**

L'équipe de Sharpe a utilisé un Primate non humain, le Ouistiti commun ou Marmouset (*Callithrix jacchus*), afin de développer un modèle proche de l'Homme (McKinnell et al. 2009). Les femelles gestantes sont gavées par 500 mg/kg/j de MBP de 7 à 15 semaines de gestation. Ceci correspond à la «masculizing programming period» du rat puisque la formation de la gonade intervient à 6 semaines de gestation et la durée de la grossesse est de 21 semaines dans cette espèce (Li et al. 2005). A la naissance, la descendance masculine des femelles ainsi traitées ne montre aucune altération du développement des testicules et des organes génitaux externes alors qu'un traitement similaire chez le rat provoque 17% d'hypospadias, 70% de cryptorchidie (Fisher et al. 2003, Mahood et al. 2007). Il en est de même des organes génitaux internes et de la testostéronémie. Cependant, contrairement à l'espèce humaine et au rat, ni le nombre ni la différenciation des cellules de Sertoli et des gonocytes ne sont affectés par le traitement des mères gestantes. Aucun gonocyte multinucléé n'est observé chez les nouveau-nés traités et témoins. Cependant, une agrégation anormale des gonocytes est néanmoins observée dans 33% des cas.

Ces résultats suggèrent que les cellules de Leydig ne sont pas affectées par les phtalates pendant la vie fœtale chez le Ouistiti, mais ceci devrait être conforté par des témoins positifs et par la démonstration de la réalité de l'exposition fœtale dans ce protocole.

## Conclusions

Alors que les valeurs toxicologiques de référence des phtalates sont souvent fondées sur l'effet anti-androgénique de ces produits chez le fœtus de rat mâle, un nombre croissant de données suggèrent, que l'activité androgénique du testicule fœtal n'est pas affectée par les phtalates chez l'homme. De même, les phtalates sont probablement sans effet sur l'activité stéroïdogène du testicule fœtal chez la souris pendant le début du développement testiculaire ainsi que chez le ouistiti.

Ce rapport est centré exclusivement sur l'exposition pendant la grossesse car cette période a été identifiée comme la plus sensible aux perturbateurs endocriniens et car il est couramment admis que les altérations des fonctions de reproduction de l'adulte trouvent, au moins en partie, leur origine pendant la vie fœtale. Peu de donnée sur le pouvoir antiandrogénique des phtalates chez le nouveau-né humain sont disponible. Un effet antiandrogénique pendant cette période ne peut être exclu car la sensibilité des cellules de Leydig varie en fonction du stade de développement comme cela a été décrit ci-dessus chez la Souris.

Si la réponse des cellules de Leydig aux phtalates, est hautement variable d'une espèce à l'autre, la plupart des études convergent pour montrer un effet délétère de ces produits sur le compartiment séminifère chez le fœtus. Cependant, la comparaison rigoureuse inter-espèce de cet effet est actuellement difficile à réaliser car les études sont peu nombreuses. D'autre part, les paramètres permettant d'évaluer cet effet sont multiples et varient d'une publication à l'autre. Il est clairement établi que les phtalates augmentent l'apparition de gonocytes multinucléés chez le rat (*Mylichreest et al. 2002, Fisher et al., 2003; Kleymenova et al., 2005; Ferrara et al., 2006; Mahood et al., 2007*) et la souris (*Gaido et al. 2007, Saffarini et al. 2012*). Mais les gonocytes multinucléés n'ont pas été observés chez le ouistiti (*McKinnell et al., 2009*). Les phtalates n'induisent pas l'apparition de gonocytes multinucléés chez le fœtus humain au premier trimestre de grossesse (*Lambrot et al. 2009*) mais ce phénomène a été décrit chez les fœtus humain plus âgés (*Heger et al. 2012*). Cette divergence observée chez l'homme s'explique peut-être par la différence du stade de développement car les gonocytes multinucléés n'apparaissent qu'en fin de vie fœtale chez le rat. Cependant, une donnée récente montre que l'induction phtalate-dépendante de gonocytes multinucléés chez les fœtus humain du 2<sup>ème</sup> semestre est très faible, à la limite de la signification statistique (*Spade et al. 2013*). Un autre paramètre sensible aux phtalates pourrait être l'apoptose de gonocytes. Les phtalates induisent fortement cette apoptose *in vitro* chez le rat (*Li & Kim, 2003, Chauvigné et al. 2009*) la souris (*Lehraiki et al. 2009*) et l'homme (*Lambrot et al., 2009, Muczynski et al. 2012a*). *In vivo*, une augmentation de l'apoptose des gonocytes fœtaux a également été décrite chez le rat

(Ferrara *et al.* 2006). Malheureusement, ce paramètre a été très peu étudié et l'induction de l'apoptose des gonocytes par les phtalates n'a pas été recherchée ni chez la souris *in vivo* ni dans les expériences de xénogreffes de testicules fœtaux humains.

Un autre paramètre commun à l'homme et aux animaux de laboratoire pourrait être recherché au niveau des cellules de Sertoli fœtales. Ces cellules sont probablement la cible primaire des phtalates dans le testicule fœtal et plusieurs données montrent des altérations de l'expression de certains gènes sertoliens à la suite de l'exposition *in utero* aux phtalates chez le rat, la souris et l'homme. Cependant, actuellement, il n'y a pas une liste de gènes dont l'expression est systématiquement modifiée chez le rat, la souris et l'Homme.



### 3.5 Effets sur le système reproducteur femelle

#### Récapitulatif de synthèse ou expertise préalable :

#### **Principales conclusions de l'expertise collective de l'INSERM de 2011 sur la base des :**

##### **-Etudes épidémiologiques:**

:

« Quatre études se sont intéressées aux anomalies du nouveau-né et de l'enfant en recherchant une exposition pendant la gestation et au cours des premiers mois de vie. Chez les fillettes, un effet sur la puberté précoce a été analysé et les résultats des études ne sont pas concluants. Chez les femmes, peu d'études ont évalué le rôle possible de l'exposition aux phtalates sur la santé reproductive. Seul le risque d'endométriose a été spécifiquement évalué et les preuves apportées par ces quelques études de l'existence possible d'un lien entre phtalates et endométriose sont insuffisantes. Les effets de l'exposition aux phtalates sur la fonction ovulatoire et certains niveaux hormonaux (oestradiol, progestérone, LH, FSH) suggérés dans les études animales ne sont pas relatés chez la femme. L'évaluation des effets des phtalates est rendue complexe du fait de la diversité au niveau des études, des populations étudiées, de la méthodologie des dosages et des limites de détection ainsi que des paramètres phénotypiques pris en compte. »

##### **-Études chez l'animal femelle :**

« Peu d'études se sont intéressées aux effets des phtalates sur l'appareil reproducteur des animaux femelles. Chez le rat femelle, après exposition in utero et néonatale au DEHP, on observe une puberté avancée ou retardée selon le moment d'administration (pour des doses de 15 ou 150 mg/kg/j) et des modifications des taux d'hormones (oestradiol, progestérone). Une réduction de la fertilité est rapportée avec le DBP après une exposition à partir du sevrage (500 mg/kg/j). Chez les femelles marmouset exposées au DEHP juste après le sevrage (3 mois) et jusqu'à la maturité sexuelle (18 mois), les analyses morphologiques du tractus génital femelle révèlent une augmentation du poids des ovaires et de l'utérus aux doses élevées ainsi qu'une augmentation des niveaux d'oestradiol circulant. En revanche, aucun changement significatif n'est observé en histologie dans les utérus et ovaires, si ce n'est un nombre un peu plus élevé de corps jaunes. L'augmentation des niveaux d'oestradiol observée chez le rat comme chez le marmouset pourrait être à l'origine de l'atrophie folliculaire décrite dans l'ovaire.

##### **Organes et tissus cibles chez la femelle :**

Les données chez l'animal femelle indiquent que l'ovaire est un organe cible de l'action des phtalates (DEHP, DBP). Les études in vitro montrent clairement une diminution de la production d'oestradiol par les cellules folliculaires ovariennes suite à l'exposition au DEHP et son principal métabolite le MEHP. L'aromatase (enzyme qui convertit la testostérone en oestradiol) pourrait être une cible directe du DEHP. D'autres organes que l'ovaire sont également des cibles potentielles comme l'hypophyse ou l'hypothalamus au niveau cérébral ou encore l'utérus et la glande mammaire comme en témoignent quelques études in vitro. »

#### **Rappel monographies du NTP/NHIES telles que publiées dans Environmental Health Perspectives, vol 105 supplément 1, Février 1997. [1-3] et étude de synthèse :**

La revue Environmental Health Perspectives a publié en 1997 des résumés d'évaluations toxicologiques conduites selon un protocole RACB, chez la souris CD-1 SWISS, par administration dans l'alimentation pour le Di-n-pentylphtalate (doses ingérées estimées à 0,76-2,16 et 4,8 g/kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>), le di-n-hexylphtalate (doses ingérées estimées à 0,38-0,80 et 1,67 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) et le di-n-propylphtalate (doses ingérées estimées à 1,9-4,06 et 8,63 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>). Il existe des publications originales associées à ces études (non revues en détail à ce stade)

non référencées dans le rapport INSERM au chapitre appareil reproducteur femelle. (à vérifier).

Pour le di-n-propylphtalate, l'étude rapporte une diminution de 44% du nombre de petits vivants/portée associée à une diminution du poids des nouveaux nés après ajustement à la taille de la portée pour les parents traités à la dose moyenne et une infertilité totale pour la plus forte dose. Les femelles traitées à cette dose étaient stériles (croisement avec des mâles non traités, cross over mating trial) et la taille de la portée des mâles traités croisés avec des femelles contrôles était diminuée de 34%. Les animaux traités des deux sexes et à la plus forte dose présentaient des signes de toxicité générale (diminution poids corporel, hépatomégalie sans modification histologique majeure). L'appareil génital même présentait de profondes altérations de poids des différents organes et qualité du sperme.

Pour le di-n-pentylphtalate, la fertilité des couples traités était profondément altérée dès la plus faible dose (diminution du nombre de portées 21% vs 100% des couples chez les contrôles ont eu une portée). La taille des portées obtenues chez les animaux traités était considérablement diminuée. Les couples traités aux doses moyenne et forte étaient totalement infertiles. Le croisement avec des animaux contrôles (crossover mating trial) a révélé que les deux sexes étaient affectés. A la plus forte dose, les animaux des deux sexes présentaient une hépatomégalie. L'appareil génital mâle présentait de profondes altérations de poids des différents organes et qualité du sperme.

Pour le di-n-hexylphtalate, la dose forte était associée à une infertilité totale, 1 seule portée a été enregistrée pour la dose moyenne. Bien que les animaux traités à la plus faible dose aient pu produire des portées viables, le nombre total de portée/couple était diminué et le nombre de petits vivants par portée était fortement diminué par rapport aux animaux contrôles. Pour la forte dose, les deux sexes étaient infertiles et présentaient une hépatomégalie modérée (+32%) sans modification du poids corporel. La quantité de sperme dans l'épididyme et la mobilité spermatique étaient fortement réduites.

Une revue récente [4], recense l'ensemble des études disponibles sur les effets sur l'appareil reproducteur femelle des phtalates diesters. Pour les phtalates rentrant dans le cadre de la saisine des données de la publication concernent les di-isononylphtalate dipropyl, di-isobutyl, di-n-pentyl, di-n-hexyl et di-isodecyl phtalates. Pour le dipropylphtalate, la revue reprend les données des protocoles RACB publiés dans EHP sur l'exposition d'animaux adultes et l'évaluation de leur capacité de reproduction. La revue réfère également à une étude récente portant sur une exposition in utero qui sera revue en détail dans la partie analyse des études récentes [5]. Les auteurs de la revue concluent que le di-n-propyl phtalate pourrait avoir des effets délétères sur la fonction de reproduction et un possible effet tératogène à forte dose par voie orale ( $>1.5 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  c'est le moins qu'on puisse dire).

Pour le Di-isobutyl phtalate, la revue cite plusieurs études chez le rat (Wistar ou Sprague-Dawley) qui concluent à l'absence d'effet de ce composé sur la gestation jusqu'à des doses de  $625 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . Cependant des études ultérieures décrivent une augmentation du taux de résorption et de mort fœtale à  $750 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  chez le rat SD. D'autres études portant sur une exposition in utero décrivent une augmentation de la distance anogénitale de ratons femelles chez le rat Wistar dès  $600 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . [6] La plupart des études référencées dans cette revue ne sont pas citées au chapitre effets sur le système reproducteur femelles des animaux du rapport INSERM.

Pour le di-n-pentyl phtalate, des effets sont décrits sur la gestation avec une augmentation de la mortalité fœtale chez le rat SD ou la souris SWISS CD-1 à forte dose ( $760 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

chez a souris). La publication chez le rat sera revue en détail dans la partie analyse des études récentes.

Des effets similaires sur la gestation sont décrits pour le di-n-hexyl phtalate chez la souris CD1 (étude RACB citée plus haut) dès  $380 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  pour une exposition sur 2 générations) et le rat SD dès  $625 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ .

Pour le di-isononlyphtalate, les auteurs de la revue soulignent quelques divergences dans la littérature concernant les effets de ce composé sur la gestation et concluent que globalement dans la limite des trois études recensées, il n'y a pas de données convaincantes suggérant que le di-isononlyphtalate pourrait avoir des effets délétères sur la gestation.

Pour le di-isodecyl phtalate, une seule étude a été recensée en 2001. Il n'y aurait pas d'effet sur le cycle oestral et le nombre d'oocytes chez des rates SD adultes et/ou leur descendantes (étude sur 2 générations). Toutefois des effets étaient observés en termes de diminution de la taille de la portée et de taux de survie des petits dès 0,4% dans la ration alimentaire, de même qu'un retard à l'ouverture vaginale.

## Données humaines

### Synthèse des études épidémiologiques sur la puberté féminine.

Le rapport d'expertise de l'INSERM ayant analysé les données disponibles avant 2011 concluait en la nécessité de réaliser d'autres études en raison des résultats discordants sur l'association entre phtalates et puberté précoce.

Trois études récentes ont été analysées : deux études de cohorte (Wolff *et al.*, 2010, Frederiksen *et al.*, 2012) et une étude transversale (Buttke *et al.*, 2012). Les trois études sont jugées de bonne qualité sans biais méthodologique majeur (effectifs importants, prise en compte adéquate des facteurs de confusion en particulier de l'IMC, évaluation du stade pubertaire par inspection et palpation dans les deux études ayant la stadification pubertaire comme critère de jugement principal, dosage des métabolites de phtalates dans les urines et méthode analytique). Il existe une bonne cohérence des résultats des deux cohortes réalisées respectivement aux Etats-Unis et au Danemark avec une corrélation positive entre la concentration des métabolites des phtalates mesurés dans les urines et la pubarche sans association retrouvée avec le développement mammaire (Wolff *et al.*, 2010, Frederiksen *et al.*, 2012). L'étude ayant évalué le lien entre phtalates et l'âge des premières règles était négative (Buttke *et al.*, 2012). Dans ces études, il n'a pas été observé d'association entre phtalates et puberté précoce.

Au total, seule une association avec une pubarche différée, compatible avec un effet anti androgénique, a été retrouvée. La signification clinique d'un retard d'apparition de la pilosité pubienne de quelques mois, effet qui ne peut pas être considéré en soi comme pathologique, est difficile à interpréter. Par ailleurs, ces études ne montrent pas de lien entre phtalates et puberté précoce féminine. Ce résultat est important même s'il doit encore être conforté car les études disponibles jusqu'en 2010 étaient discordantes et ne permettaient pas de conclure de façon univoque.

L'ensemble des études analysées sur la puberté sont mentionnées dans le Tableau 16 : Tableau récapitulatif des études épidémiologiques analysées (reproduction féminine-puberté féminine)

L'étude de **Yum *et al.* (2013)** est une étude Sud-Coréenne de type cas-témoins réalisée chez 150 filles âgées de 6 à 12 ans présentant une puberté précoce (caractères sexuels secondaires survenus avant 8 ans ou ménarche avant 9,5 ans) comparées à 90 enfants non pubères (même médiane mais intervalle d'âge non décrit).

Parmi les substances PE étudiées dans le plasma, 4 phtalates ont été mesurées : DEHP, DBP, MEHP et MBP.

Les niveaux plasmatiques de MBP étaient 1,3 fois plus élevés chez les cas comparé aux témoins mais l'association n'était pas significative ( $p=0,11$ ).

La présentation des résultats dans l'abstract qui conclue que le phtalate MBP a un effet sur la puberté précoce alors que, comme les auteurs l'écrivent dans le chapitre « Résultats », l'association n'est pas significative jette le doute sur l'honnêteté intellectuelle des auteurs, doute renforcé par les insuffisances majeures, du titre à la conclusion.

De plus, il n'y a pas eu *a priori* d'ajustement sur l'IMC, facteur pourtant important à prendre en compte dans une étude sur la puberté précoce.

Au total : le résultat est négatif. Cet article est de très mauvaise qualité avec des limites majeures tant sur le fond que sur la forme.

## **Synthèse des études épidémiologiques sur l'appareil reproducteur féminin.**

**Etude de Kim *et al.* Increased plasma levels of phtalate esters in women with advanced-stage endometriosis : a prospective case-control study. Fertility & Sterility 2011 ; 96 :357-9.**

### Type :

Suivi prospectif d'une cohorte dans un centre de chirurgie gynécologique en Corée

### Objectifs :

Evaluation des concentrations plasmatiques de DEHP et de MEHP (principal métabolite de DEHP) chez des femmes présentant une endométriose à un stade avancé.

Publication : Journal de bon niveau (Impact Factor environ 4)

Financement : public (Ministère de la Santé de Corée)

### Descriptif des groupes :

266 femmes ayant eu une chirurgie pelviscopique, une laparotomie exploratrice, une myomectomie ou une hystérectomie transabdominale entre janvier et septembre 2009, non exposées à des toxiques pour la reproduction, ni tabac, alcool, et autres addiction, pas d'hormonothérapie pendant les 12 mois précédents.

97 femmes ont une endométriose sévère (chirurgicalement et histologiquement)- 47 stade III et 50 stade IV (Stades de l'American Society of Reproductive Medicine).

169 femmes n'ont pas d'endométriose mais une indication chirurgicale (contrôles) : 54 kystes ovariens, 99 fibromes utérins, 16 cancer du col in situ.

Les stades minimes et les cancers sont exclus.

### Paramètres évalués :

Concentrations plasmatiques de DEHP et de MEHP chez les patientes ayant une endométriose sévère par rapport aux contrôles.

Matériel de prélèvement en verre.

HPLC et spectrométrie de masse. Mesures séparées pour les 2 composés.

### Analyse statistique :

Regression logistique multiple

Ajustement sur l'âge et le BMI.

### Principaux résultats :

Pas de différence pour l'âge entre les groupes.

Chez les femmes ayant une endométriose sévère, la parité et le BMI sont significativement diminués et les concentrations de MEHP et de DEHP plasmatiques significativement augmentées (17.4 +/- 1.5 ng/mL vs 12.4 +/- 1.1 ng/mL pour MEHP, et 179.7 +/- 32.5 ng/mL vs 92.5 +/- 31.1 ng/mL pour DEHP).

De plus, l'augmentation de MEHP (métabolite de DEHP) est plus marquée que celle du DEHP.

Entre les sous-groupes de pathologies chez les contrôles : pas de différences de concentrations plasmatiques pour MEHP et DEHP. Idem pour les sous-groupes d'endométriose de stade III et IV.

### Conclusion des auteurs :

Les concentrations plasmatiques de DEHP et de MEHP (son métabolite) sont plus élevées chez les patientes ayant une endométriose sévère, ce qui conforte l'hypothèse d'un rôle des phtalates dans l'apparition de l'endométriose déjà retrouvée par d'autres auteurs.

Cet effet est plus marqué pour le MEHP.

#### Qualité de l'étude :

Effectifs de patientes corrects.

Validité de la mesure des phtalates dans le plasma à discuter.

Mesure de 2 phtalates seulement (dont l'un est le métabolite de l'autre, très ubiquitaire).

Rôle des procédures chirurgicales ou des traitements médicamenteux sur les taux de phtalates pas pris en compte (contamination).

#### Conclusion des experts:

Etude difficile à retenir en l'état.

### **Etude de Toft G *et al.* Association between pregnancy loss and urinary phtalate levels around time of conception. Environmental Health Perspectives, 2012, 120:458-463**

Type d'étude : étude de cohorte sur population danoise entre 1992 et 1994

Objectifs : étude de l'association entre l'exposition aux phtalates et des fausses couches spontanées

Publication : Environmental Health Perspectives

Financement : Fondations pour la Recherche Universitaire danoise, ministère de la Santé danois, Fondation Lundbeck, AFA (Compagnie d'assurances)

#### Descriptif des groupes :

430 couples âgés entre 20 et 35 ans, sans contraception, n'ayant jamais eu de grossesse, en désir d'enfant suivi pour l'étude de leur fertilité jusqu'à l'apparition d'une grossesse, au maximum sur 6 cycles. Echantillon urinaires prélevés chaque jour dans les 10 premiers jours des cycles menstruels. Enregistrement quotidien sur leur environnement et leur santé (patientes et partenaires). Echantillon d'urines chez chaque femme, avec un maximum de 2, un 4 jours avant la conception (soit le 10<sup>ème</sup> jour du cycle fécondant), et un 18 jours avant la conception (soit au 10<sup>ème</sup> jour du cycle précédent celui de la conception) .

Mesure en 2009 des échantillons urinaires pour 242 femmes sur 430 incluses (certaines enceintes dès le 1<sup>er</sup> cycle, mais perte de 11 tubes d'urines pour raison inconnue). Age, alcool et tabac similaires chez celles pour lesquelles on a échantillon / celles pour lesquelles il est perdu.

128 femmes enceintes pendant la période de l'étude qui ont échantillon urines pour mesure des phtalates, dont 80 qui ont eu un enfant vivant et 48 qui ont eu une FCS dont 32 biologiques.

Paramètres évalués : apparition d'une fausse couche précoce, soit biologique (après un saignement menstruel, hCG >1 UI/L puis chute des hCG) soit clinique (attestée par un médecin).

Mesure de l'exposition : extraction phase solide et analyse par LC/MS/MS. Mesure H-MEP, H-MBP, H-MEHP, C-MBzP, C-OH MEHP et oxo-MEHP.

Analyse statistique : Estimation des ORs pour les FCS par rapport à la concentration de métabolite de phtalate groupée en tertiles par regression logistique. Résultats entre cycle préconception et le cycle où il y a eu conception sont séparés. De plus, modèles logistiques pour estimer les associations avec FCS biologiques et tardives comparées à celles qui ont mené des grossesses sans FCS. Ajustement sur facteurs confondants pertinents.

### Principaux résultats :

Parmi tous les métabolites de phtalates mesurés dans les cycles où il y a eu fécondation, seules les concentrations de MEHP sont significativement plus élevées chez femmes ayant fait une FCS /celles qui n'en ont pas fait (23.4 ng/mL (<LOD-84.0) vs 16.2 ng/mL (<LOD-64.0).p : 0.01. Parmi les femmes ayant fait une FCS : moins de fumeuses et tendance à plus de caféine par jour.

Pas de significativité pour les mesures de phtalates effectuées dans le cycle précédant la conception.

Pour le cycle où il y a eu conception, il y a un effet –dose pour le MEHP (53% de FCS au 3<sup>ème</sup> tertile vs 31% dans le 1<sup>er</sup> tertile) : OR : 2.87 (1.09-7.57) entre le 3<sup>ème</sup> et le 1<sup>er</sup> tertile. Pas de relation effet-dose pour les autres métabolites de MEHP (5 hydroxy et 5 oxo).

Parmi les 48 FCS : 32 détectées sur hCG et 16 plus tardives. Parmi les FCS précoces, le taux de FCS augmente significativement avec le niveau de MEHP. OR pour est de 40.67 (4.48-369.5) pour niveau de MEHP au tertile le plus élevé par rapport aux tertile le plus bas (51 vs 3%). Les FCS plus tardives sont significativement inversement associées au niveau de MEHP.

### Conclusion des auteurs

Association significative entre MEHP péri-conceptionnel et perte de grossesse. De plus, les pertes précoces sont plus fréquentes aux plus hauts niveaux de MEHP. Pas d'association avec les autres métabolites.

### Qualité de l'étude et de la conclusion proposée

Etude de bonne qualité sur une cohorte prospective. Un dérivé (MEHP) en concentration supérieure (23.4 ng/mL (<LOD-84.0) vs 16.2 ng/mL (<LOD-64.0).p : 0.01) chez des femmes faisant une FCS, en particulier biologique (avant le retard de règles). Effet significativement associé à des concentrations élevées (3<sup>ème</sup> tertile) pour les mesures effectuées juste avant la conception, mais pas pour les mesures effectuées 18 jours avant la conception.

Effectifs très faibles (48 évènements utilisables pour l'étude) et certains résultats peuvent résulter de la multiplicité des calculs.

Résultats non significatifs pour tous les autres phtalates et les dérivés du MEHP, ce qui invaliderait une relation causale de ce phtalate en particulier.

La pertinence des dates de mesures par rapport à l'évènement (FCS), n'est pas claire : quelle conclusion tirer d'une mesure de phtalates ponctuelle 4 jours avant la conception sur un évènement qui se déroulera de 14 à plus de 42 jours plus tard ?

### Conclusion des experts:

Résultats difficiles à retenir en l'état.

**Etude de Weuve J et al. Association of exposure to phtalates with endometriosis and utérine leiomyomata : findings from NHANES, 1999-2001. Environmental Health Perspectives, 2010 ; 118 :825-832.**

### Type d'étude :

Etude transversale de représentation nationale (USA)

### Objectifs :

Etude de l'association entre la mesure de phtalates urinaires et un antécédent d'endométriose ou de fibrome utérin.

Publication :

Journal de rang 1

Financement :

Public (NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey), CDC

Descriptif du groupe :

Cohorte de 1227 femmes âgées de 20 à 54 ans, incluses dans le programme général NHANES au cours de 3 cycles : 1999-2000, 2001-2002, 2003-2004 habitant 87 localités différentes aux USA.

Collecte d'informations sur la santé de la population à partir de questionnaires, d'exams cliniques et de tests de laboratoire. Interviews à domicile ou en ambulatoire (exams et prélèvements de sang et d'urines)

Paramètres étudiés :Phtalates :

-Mesures de MEHP, DEHP, MBP, MEP, MBzP urinaires effectuées à 3 périodes différentes d'une journée (matin, après-midi ou soir), avec la mesure de la créatinine.

-Pour la période 2001-2002, mesure supplémentaire de MEHHP et MEOHP (métabolites oxydés de DEHP dont la mesure est peut-être plus sensible que celle du DEHP). DEHP= somme des concentrations molaires de MEHP, MEHHP et MEOHP.

-Pour la période 2003-2004, le MECPP (autre métabolite du DEHP) a été mesuré.

Clinique :

-Autosignalement par les femmes d'une notion de fibrome ou d'endométriose diagnostiqués par un médecin. Si réponse positive, l'âge de la femme au moment du diagnostic est relevé.

-Covariables : âges des premières règles, gravidité, parité, statut en cours vis à vis d'une grossesse ou d'un allaitement, contraception hormonale, ménopause, chirurgie gynécologique (à partir des questionnaires NHANES). Age, race/ethnie à partir des interviews NHANES à domicile.

Analyse statistique :

Regression logistique multiple entre les quartiles de concentrations urinaires de chaque métabolite mesuré et la présence d'une endométriose, ou d'un fibrome utérin, ou de l'un ou l'autre de ces deux évènements (« groupe combiné » pour augmenter la puissance statistique).

Principaux résultats :

Sur 1227 femmes incluses, 87 (7%) et 151 (12%) ont eu un diagnostic d'endométriose ou de fibrome respectivement, et 201 (16%) ont l'un ou l'autre (34 femmes -3%- ont les 2 pathologies et 3 ne savent plus quand le diagnostic a été posé).

Endométriose : diagnostic < 1 an à 34 ans avant l'étude NHANES (médiane 9 ans)

Fibrome : diagnostic < 1 an à 36 ans avant l'étude NHANES (médiane 7 ans)

Les concentrations de MBP urinaire sont légèrement plus élevées (mais non significatif) parmi les femmes qui ont eu une endométriose.

Les concentrations de MBP urinaire sont faiblement associées (mais non significatives) à une endométriose ou à un fibrome dans les antécédents. Chez celles ayant eu une endométriose ou un fibrome (groupe « combiné »), plus les concentrations sont élevées, plus le diagnostic d'une des deux pathologies est fréquent. OR= 1.71 (IC 95% 1.07-2.75) entre le quartile le plus élevé et le plus bas.



Parmi les femmes qui ont eu une endométriose ou un fibrome (« groupe combiné »), les concentrations de MEHP sont significativement diminuées par rapport aux femmes qui ne sont pas atteintes ( $p=0.03$ ).

Les concentrations de MEHP sont inversement associées à la présence des deux pathologies. Endométriose : OR= 0.44 (IC 95% 0.19-1.02) avec des ORs qui diminuent progressivement avec l'augmentation des niveaux de MEHP ( $p_{\text{trend}}=0.05$ ). Fibrome : OR= 0.63 (IC 95% 0.35-1.12). Pour les deux pathologies combinées OR= 0.59 (IC 95% 0.37-0.95) et tendance entre les quartiles croissants de MEHP significative ( $p_{\text{trend}}=0.03$ ).

Ces résultats sont renforcés lorsque sont retirées les femmes qui ont eu un diagnostic de fibrome (ou d'hystérectomie) plus de 7 ans avant l'inclusion dans l'étude NHANES ou celles pour lesquelles le diagnostic d'endométriose a été fait plus de 5 ans avant.

Pour les métabolites oxydés de DEHP (MEHHP et MEOHP), les résultats sont concordants avec ceux de MEHP pour l'endométriose mais pas pour les fibromes.

Pour le MECPP (mesuré seulement entre 2003 et 2004), les résultats vont dans le même sens (relation inverse entre concentrations urinaires et endométriose, et pas d'association avec les fibromes).

MEP et MBzP : pas d'association entre leurs concentrations urinaires et les 2 pathologies étudiées.

Pas d'impact sur les résultats de la parité, de l'usage d'une contraception orale (ou de son exclusion).

Pas d'impact sur les résultats de l'absence de rapport à la créatinine, ou si les femmes dont la créatinine est aux extrêmes sont incluses.

#### Conclusions des auteurs :

Association positive faible entre les taux urinaires de MBP, et associations inverse faible entre les taux urinaires de MEHP et des antécédents auto-signalés d'endométriose ou de fibrome utérin.

Les résultats pour les métabolites de DEHP (MEHHP et MEOHP) sont concordants avec les résultats pour le MEHP pour l'endométriose, mais pas pour les fibromes.

#### Qualité de l'étude et conclusion proposée :

Etude de bonne qualité.

Mesures urinaires, population importante et assez représentative du territoire américain, prise en compte des facteurs de confusion importants.

Limitations :

-mesure de l'exposition aux phtalates effectuées parfois plusieurs années après le diagnostic d'endométriose ou de fibrome (rôle de la présence de DBP ou de DEP dans les traitements de ces pathologies, rôle d'une contamination des ustensiles nécessaires à la prise en charge biologique ou médicale de ces pathologies...)

-l'absence de bio-accumulation des phtalates et leur demi-vie courte dans l'organisme rendent la mesure unique effectuée ici fragile.

-les pathologies sont rapportées par les femmes uniquement (sans vérification par un médecin) (risque d'erreur ou de mauvaise classification).

-discordance des résultats pour les fibromes entre le MEHP et les métabolites du DEHP.

Pour les auteurs, relation entre MBP et MEHP et ces deux pathologies // limite majeure énoncée par les auteurs eux-mêmes de l'auto-reporting de ces deux pathologies par les patientes elles-mêmes

#### Conclusion des experts:

**Etude non retenue** eu égard aux biais méthodologiques (self-reporting – mélange des deux pathologies) résultats statistiques à la limite de la signification, portant sur premier versus quatrième quartile, et significatif uniquement quand les deux pathologies sont poolées (puissance insuffisante de l'étude).

### **En conclusion**

Relation positive faible entre les taux urinaires de MBP et un diagnostic d'endométriose ou de fibrome dans les antécédents rapportés par les patientes, relation inverse faible pour le MEHP.

Limitations assez importantes des résultats, en particulier sur la pertinence chronologique des événements (mesures effectuées plusieurs années après le diagnostic) et sur la fiabilité (auto-signallement).

Tableau 16 : Tableau récapitulatif des études épidémiologiques analysées (reproduction féminine- puberté féminine)

Effets sur la puberté féminine								
Référence Titre de l'article	Type d'étude	Population investiguée	Mesure des phtalates	Méthode analytique	Critères de jugement Ajustements	Résultats / discussion	Qualité de l'étude	Chapitre(s) concerné(s)
(Wolff <i>et al</i> , EHP 2010) Investigation of Relationships between Urinary Biomarkers of Phytoestrogens, Phtalates, and Phenols and Pubertal Stages in Girls.	Étude de cohorte	Fillettes nord-américaines N total = 1151 filles âgées de 6 à 8 ans à l'inclusion (2004-2007) Effectif suffisant	Urinaire (µg/g créatinine) à V1 (n=1149) Métabolites de haut PM (MPzP, MCPP, MEHP, MEOHP, MEHHP, MECPP) et de bas PM (MEP, MBP, MIBP)	HPLC couplée à spectrométrie de masse	V1 : mesure des métabolites urinaires et V2 1an après Développement pubertaire : Seins : S1-S5 Pilosité pubienne : P1-P5  - Origine ethnique -Age - Poids et Taille -Ajustement sur percentile IMC selon l'âge (relation entre puberté, biomarqueurs et BMI analysée de façon dichotomisée en utilisant la médiane de chaque âge (BMI bas vs élevé)	<u>Résultats</u> : biomarqueurs urinaires détectés dans pratiquement tous les échantillons d'urines (classement des biomarqueurs par quintiles) A la visite 2 (V2): développement mammaire chez 30 % et pilosité pubienne chez 22 % de la population étudiée Association négative entre la somme des concentrations de phtalates de haut PM et stade de pilosité pubienne. Tendance à une association positive entre la somme des concentrations de phtalates de faible PM et le stade de développement mammaire et de pilosité pubienne. Pas de modification de ces effets selon le BMI <u>Conclusion des auteurs</u> : Les résultats confirment l'hypothèse testée pour les phtalates de haut poids moléculaire dont la concentration est inversement corrélée aux stades de pilosité pubienne (p=0,04). Il n'a pas été observé d'association significative entre les phtalates de bas poids moléculaire et le développement mammaire mais une tendance avec une thélarche plus précoce a été retrouvée (p=0,09). Les auteurs ne savent pas expliquer les résultats inverses observés avec les phtalates de bas poids moléculaire. <u>Commentaires</u> : Résultats en faveur d'une association faible entre l'exposition aux phtalates et le développement pubertaire chez la petite fille.	Étude de bonne qualité sans limites méthodologiques majeures Taille de la population importante Des biais bien identifiés mais difficiles à éviter Un certain nombre de questions restent en suspens (fenêtres critiques d'exposition pour le développement pubertaire, mécanisme d'action,...)	1.4 Effets sur le système reproducteur femelle 1.4.1 Données humaines

Effets sur la puberté féminine								
Référence Titre de l'article	Type d'étude	Population investiguée	Mesure des phtalates	Méthode analytique	Critères de jugement Ajustements	Résultats / discussion	Qualité de l'étude	Chapitre(s) concerné(s)
<b>Buttke et al, EHP 2012)</b> Exposures to endocrine-disrupting chemicals and age of menarche in adolescent girls in NHANES (2003-2008).	étude transversale	Fillettes nord-américaines de 12 à 16 ans participant à l'enquête NHANES âgées de 12 à 16 ans ayant répondu aux questionnaires concernant la reproduction et eu un examen clinique et des dosages urinaires N total = 437 filles	Urinaire (µg/g créatinine) métabolites des phtalates totaux Monomethyl phtalate Monoethylphtalate Monobutyl P Mono-isobutyl P Mono-isobutyl P Mono(3-carboxypropyl) P Monocyclohexyl P Mono (2-ethylhexyl) P Monooctyl P Monobenzyl P Monoisononyl P Mono(2-ethyl-5-oxohexyl)P Mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)P Monocarboxyoctyl P Monocarboxynonyl P	HPLC	Endpoint : Age des premières règles Ajustements sur : - Race/ ethnique - IMC - Statut socioéconomique - tabagisme maternel pendant la grossesse - poids à la naissance	<u>Résultats :</u> Absence de lien retrouvé entre l'exposition aux phtalates évaluée par un taux urinaire en métabolites et l'âge des premières règles.  Commentaire des auteurs : Mesure ponctuelle des métabolites urinaires des phtalates réalisée après le début des premières règles chez toutes les filles sauf pour 43 participantes. Idéalement, la mesure aurait dû être faite à plusieurs reprises dans les 6-36 mois précédant la ménarche et ajustée sur l'IMC seulement avant la ménarche.	Étude de bonne qualité sans limites méthodologiques majeures  Biais possibles : autodéclaration de l'âge des premières règles et surtout mesure biologique unique.	1.4 Effets sur le système reproducteur femelle  1.4.1 Données humaines
Référence Titre de l'article	Type d'étude	Population investiguée	Mesure des phtalates	Méthode analytique	Critères de jugement Ajustements	Résultats / discussion	Qualité de l'étude	Chapitre(s) concerné(s)
<b>(Fredericksen et al, International Journal of Andrology, 2012)</b> High urinary	Étude de cohorte	- Cohorte de 725 jeunes-filles danoises en bonne santé recrutées pendant la période 2006-2008	Métabolites urinaires : 12 métabolites primaires et secondaires de 5	HPLC couplée à spectrométrie de masse	V1 : mesure des métabolites urinaires et V2 1an après	<u>Résultats :</u> Une excrétion élevée en métabolites des phtalates était associée avec une pubarchie différée (âge moyen 11,4 ans	Bonne qualité méthodologique avec un effectif conséquent du groupe de jeunes-filles en bonne santé,	1.4 Effets sur le système reproducteur femelle  1.4.1 Données

<p>phtalate concentraation associated with delayed pubarche in girls.</p>		<p>(The COPENHAGEN Puberty Study) - 25 jeunes-filles avec une puberté précoce</p>	<p>diesters de phtalates (DEP, DBP, BBzP, DEHP et DiNP).</p>		<p>Développement pubertaire : Seins : S1-S5 Pilosité pubienne : P1-P5  - Origine ethnique -Age - Poids et Taille -Ajustement sur percentile IMC selon l'âge (relation entre puberté, biomarqueurs et BMI analysée de façon dichotomisée en utilisant la médiane de chaque âge (BMI bas vs élevé)</p>	<p>[11,1-11,7] dans le quatrième quartile d'exposition comparé à 10,7 ans [10,4-11] dans le premier quartile), ce qui pourrait suggérer une action anti-androgénique des phtalates. Cette tendance était statistiquement significative quand tous les métabolites des phtalates (sauf pour le MEP) étaient additionnés et exprimés en quartiles. Il n'a pas été retrouvé d'association entre phtalates urinaires et développement mammaire. Les concentrations en métabolites urinaires des phtalates n'étaient pas différentes entre les jeunes-filles avec une puberté précoce et le groupe contrôle. <b>En conclusion</b> L'exposition aux phtalates, évaluée par les concentrations des métabolites dans les urines chez 725 jeunes-filles en bonne santé, était associée à une pubarchie plus tardive sans effet sur le développement mammaire.</p>	<p>Bonne méthode d'évaluation du développement pubertaire et réalisation de dosages sanguins (FSH, E2, T).  L'article n'est pas suffisamment explicite sur la prise en compte des principaux facteurs de confusion.  En particulier, la prise en compte de paramètres majeurs comme l'IMC n'est pas explicitée dans l'article.</p>	<p>humaines</p>
---	--	---	--	--	--	--	--	-----------------

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des études épidémiologiques analysées (reproduction féminine- endométriose)

Effets sur l'endométriose								
Référence Titre de l'article	Type d'étude	Population investiguée	Mesure des phtalates	Méthode analytique	Critères de jugement Ajustements	Résultats / discussion	Qualité de l'étude	Chapitre(s) concerné(s)
<b>Weuve J et al.</b> <b>Association of exposure to phtalates with endometriosis and utérine leiomyomata : findings from NHANES, 1999-2001.</b> <b>Environmental Health Perspectives, 2010 ; 118 :825-832.</b>	Etude transversale de représentatio n nationale (USA)	Cohorte de 1227 femmes âgées de 20 à 54 ans, incluses dans le programme général NHANES au cours de 3 cycles : 1999-2000, 2001-2002, 2003-2004 habitant 87 localités différentes aux USA.  Collecte d'informations sur la santé de la population à partir de questionnaires, d'examen s cliniques et de tests de laboratoire. Interviews à domicile ou en ambulatoire (examens et prélèvements de sang et d'urines)	-Mesures de MEHP, DEHP, MBP, MEP, MBzP urinaires effectuées à 3 périodes différentes d'une journée (matin, après-midi ou soir), avec la mesure de la créatinine.  -Pour la période 2001-2002, mesure supplémentaire de MEHHP et MEOHP (métabolites oxydés de DEHP dont la mesure est peut-être plus sensible que celle du DEHP). DEHP= somme des concentrations molaires de MEHP, MEHHP et MEOHP.  -Pour la période 2003-2004, le MECPP (autre	HPLC couplée à spectrométrie de masse	-Autosignalement par les femmes d'une notion de fibrome ou d'endométriose diagnostiqués par un médecin. Si réponse positive, l'âge de la femme au moment du diagnostic est relevé.  Endométriose : diagnostic < 1 an à 34 ans avant l'étude NHANES (médiane 9 ans)  Fibrome : diagnostic < 1 an à 36 ans avant l'étude NHANES (médiane 7 ans)  -Covariables : âges des premières règles, gravidité, parité, statut en cours vis à vis d'une grossesse ou d'un allaitement, contraception hormonale, ménopause, chirurgie gynécologique (à partir des questionnaires NHANES). Age,	<u>Résultats :</u> Sur 1227 femmes incluses, 87 (7%) et 151 (12%) ont eu un diagnostic d'endométriose ou de fibrome respectivement, et 201 (16%) ont l'un ou l'autre.  Les concentrations de MBP urinaire sont faiblement associées (mais non significatives) à une endométriose ou à un fibrome dans les antécédents. Chez celles ayant eu une endométriose ou un fibrome (groupe « combiné »), plus les concentrations sont élevées, plus le diagnostic d'une des deux pathologies est fréquent. OR= 1.71 (IC 95% 1.07-2.75) entre le quartile le plus élevé et le plus bas.  Parmi les femmes qui ont eu une endométriose ou un fibrome (« groupe combiné »), les concentrations de MEHP sont significativement diminuées par rapport aux femmes qui ne sont pas atteintes (p=0.03).  Pour les métabolites oxydés de DEHP (MEHHP et MEOHP), les résultats sont concordants avec ceux de MEHP pour l'endométriose mais pas pour les fibromes.  Pour le MECPP (mesuré seulement entre 2003 et 2004), les résultats vont dans le même sens (relation inverse entre concentrations urinaires et endométriose, et pas d'association avec les fibromes).  MEP et MBzP : pas d'association entre leurs concentrations urinaires et les 2 pathologies étudiées.  Pas d'impact sur les résultats de la parité, de l'usage d'une contraception orale (ou de son exclusion).  <u>Conclusion des auteurs :</u>  Association positive faible entre les taux urinaires de MBP et des antécédents auto-signalés	Etude de bonne qualité.  Mesures urinaires, population assez représentative du territoire américain, prise en compte des facteurs de confusion importants.  <u>Limitations :</u>  -pas de détail sur la précision des mesures  -mesure de l'exposition aux phtalates effectuées parfois plusieurs années après le diagnostic d'endométriose ou de fibrome (rôle de la présence de DBP ou de DEP dans les traitements de ces pathologies, rôle d'une contamination des ustensiles nécessaires à la prise en charge biologique ou médicale de ces pathologies ?...)  -l'absence de bio-accumulation des phtalates et leur demi-vie courte dans l'organisme rendent la mesure unique effectuée ici fragile.  -les pathologies sont rapportées par les femmes uniquement (sans vérification par un médecin) (risque d'erreur ou de mauvaise classification).  -discordance des résultats	1.4 Effets sur le système reproducteur femelle  1.4.1 Données humaines

			métabolite du DEHP) a été mesuré.		race/ethnie à partir des interviews NHANES à domicile. Regression logistique multiple entre les quartiles de concentrations urinaires de chaque métabolite mesuré et la présence d'une endométriose, ou d'une fibrome utérin, ou de l'un ou l'autre de ces deux événements (« groupe combiné » pour augmenter la puissance statistique).	d'endométriose ou de fibrome utérin, et association inverse faible entre les taux urinaires de MEHP et des antécédents auto-signalés d'endométriose ou de fibrome utérin.  Les résultats pour les métabolites de DEHP (MEHHP et MEOHP) sont concordants avec les résultats pour le MEHP pour l'endométriose, mais pas pour les fibromes.  <u>Commentaires :</u>	pour les fibromes entre le MEHP et les métabolites du DEHP.  -puissance insuffisante de l'étude (résultats positifs uniquement si les deux pathologies sont poolées) et résultats à la limite de la significativité et uniquement entre les quartiles le plus faible et le plus élevé.	
<b>Effets sur l'endométriose</b>								
Référence Titre de l'article	Type d'étude	Population investiguée	Mesure des phtalates	Méthode analytique	Critères de jugement Ajustements	Résultats / discussion	Qualité de l'étude	Chapitre(s) concerné(s)
<b>Kim et al.</b> <b>Increased plasma levels of phtalate esters in women with advanced-stage endometriosis : a prospective case-control study. Fertility &amp; Sterility 2011 ; 96 :357-9.</b>	Cohorte prospective dans un centre de chirurgie gynécologique en Corée	266 femmes ayant eu une chirurgie gynécologique entre janvier et septembre 2009, non exposées à des toxiques pour la reproduction, ni tabac, alcool, et autres addiction, pas d'hormonothérapie pendant les 12	Concentrations plasmatiques de DEHP et de MEHP chez les patientes ayant une endométriose sévère par rapport aux contrôles.  Matériel de prélèvement en verre.	HPLC et spectrométrie de masse. Mesures séparées pour les 2 composés.	Regression logistique multiple Ajustement sur l'âge et le BMI.	<u>Résultats :</u>  Chez les femmes ayant une endométriose sévère, la parité et le BMI sont significativement diminués et les concentrations de MEHP et de DEHP plasmatiques significativement augmentées (17.4 +/- 1.5 ng/mL vs 12.4 +/- 1.1 ng/mL pour MEHP, et 179.7 +/- 32.5 ng/mL vs 92.5 +/- 31.1 ng/mL pour DEHP).  De plus, l'augmentation de MEHP (métabolite de DEHP) est plus marquée que celle du DEHP (10 fois plus).  Entre les sous-groupes de pathologies chez les contrôles : pas de différences de concentrations plasmatiques pour MEHP et DEHP. Idem pour les	Effectifs de patientes corrects.  Validité de la mesure des phtalates dans le plasma discutable. Aucune précision sur LOD ni LOQ.  Mesure de 2 phtalates seulement (dont l'un est le métabolite de l'autre, très ubiquitaire). De plus incohérence dans la mesure 10 fois supérieure de MEHP/DEHP, alors que DEHP est le composé	1.4 Effets sur le système reproducteur femelle  1.4.1 Données humaines

		mois précédents. 97 endométrioses sévères 169 femmes n'ont pas d'endométriose mais une indication chirurgicale (contrôles)				sous-groupes d'endométriose de stade III et IV. <u>Commentaire des auteurs :</u> Les concentrations plasmatiques de DEHP et de MEHP (son métabolite) sont plus élevées chez les patientes ayant une endométriose sévère, ce qui conforte l'hypothèse d'un rôle des phtalates dans l'apparition de l'endométriose déjà retrouvée par d'autres auteurs. Cet effet est plus marqué pour le MEHP.	parent. Rôle des procédures chirurgicales ou des traitements médicamenteux sur les taux de phtalates pas pris en compte (contamination).	
--	--	--	--	--	--	--	---	--

Tableau 18 Tableau récapitulatif des études épidémiologiques analysées (reproduction féminine- fausses-couches spontanées)

Effets sur les fausses couches spontanées								
Référence Titre de l'article	Type d'étude	Population investiguée	Mesure des phtalates	Méthode analytique	Critères de jugement Ajustements	Résultats / discussion	Qualité de l'étude Grille Quadas ?	Chapitre(s) concerné(s)
<b>Toft G et al. Association between pregnancy loss and urinary phtalate levels around time of conception. Environmental Health Perspectives, 2012, 120:458-463</b>	Etude de cohorte sur population danoise entre 1992 et 1994	430 couples âgés entre 20 et 35 ans, sans contraception, n'ayant jamais eu de grossesse, en désir d'enfant, suivis pour l'étude de leur fertilité jusqu'à l'apparition d'une grossesse, au maximum sur 6 cycles. 128 femmes enceintes pendant la période de l'étude qui ont échantillon urines pour mesure des phtalates, dont <b>80</b> qui ont eu	Echantillon d'urines chez chaque femme, avec un maximum de 2, le 1 <sup>er</sup> 4 jours avant la conception (soit le 10 <sup>ème</sup> jour du cycle fécondant), et le 2 <sup>ème</sup> 18 jours avant la conception (soit au 10 <sup>ème</sup> jour du cycle précédant celui de la conception).  Mesure H-MEP, H-MBP, H-MEHP, C-MBzP, C-OH MEHP et oxo-MEHP.	Extraction phase solide et analyse par LC/MS/MS.  Pas de précision sur LOQ et LOD, sauf pour MEHP.	Apparition d'une fausse couche précoce, soit biologique (après un saignement menstruel, hCG >1 UI/L puis chute des hCG) soit clinique (attestée par un médecin).  Phtalate groupés en tertiles. Regression logistique. Ajustement sur facteurs confondants pertinents.	<u>Résultats :</u> Parmi tous les métabolites de phtalates mesurés dans les cycles où il y a eu fécondation, seules les concentrations de MEHP sont significativement plus élevées chez femmes ayant fait une FCS /celles qui n'en ont pas fait (23.4 ng/mL (<LOD-84.0) vs 16.2 ng/mL (<LOD-64.0).p : 0.01). Parmi les femmes ayant fait une FCS : moins de fumeuses et tendance à plus de caféine par jour.  Pas de significativité pour les mesures de phtalates effectuées dans le cycle précédant la conception.  Pour le cycle où il y a eu conception, effet -dose pour le MEHP (53% de FCS au 3 <sup>ème</sup> tertile vs 31% dans le 1 <sup>er</sup> tertile) : OR : 2.87 (1.09-7.57) entre le 3 <sup>ème</sup> et le 1 <sup>er</sup> tertile. Pas de relation effet-dose pour les autres métabolites de MEHP (5 hydroxy et 5 oxo).  Parmi les 48 FCS : 32 détectées sur hCG et 16 plus tardives. Le taux de FCS précoces (< 42 jours) augmente significativement avec le niveau de MEHP. OR = 40.67 (4.48-369.5) pour niveau de MEHP au tertile le plus élevé par rapport aux	Un dérivé (MEHP) en concentration supérieure (23.4 ng/mL (<LOD-84.0) vs 16.2 ng/mL (<LOD-64.0).p : 0.01) chez des femmes faisant une FCS, en particulier biologique (avant le retard de règles). Effet significativement associé à des concentrations élevées (3 <sup>ème</sup> tertile) pour les mesures effectuées juste avant la conception (4 jours), mais pas pour les mesures effectuées 18 jours avant la conception.  Effectifs très faibles (48 événements utilisables pour l'étude) et certains résultats peuvent résulter de la multiplicité des calculs.  Résultats non significatifs	1.4 Effets sur le système reproducteur femelle 1.4.1 Données humaines



		un enfant vivant et <b>48</b> qui ont eu une FCS dont 32 biologiques.				<p>tertile le plus bas (51 vs 3%). Les FCS plus tardives sont significativement inversement associées au niveau de MEHP.</p> <p><u>Conclusion des auteurs :</u></p> <p>Association significative dose-dépendante entre MEHP péri-conceptionnel et perte de grossesse surtout précoce (avant le retard de règles). Pas d'association avec les autres composés.</p>	<p>pour tous les autres phtalates et les dérivés du MEHP, ce qui invaliderait une relation causale de ce phtalate en particulier.</p> <p>Pertinence des dates de mesures par rapport à l'évènement (FCS), n'est pas claire : quelle conclusion tirer d'une mesure de phtalates ponctuelle 4 jours avant la conception sur un évènement qui se déroulera de 14 à plus de 42 jours plus tard ?</p>
--	--	---	--	--	--	---	--

L'ensemble des études analysées sur l'appareil reproducteur féminin sont mentionnées dans les Tableau 16.

### Données chez l'animal

Dans sa forme actuelle, ce rapport synthétise les données expérimentales récentes (2011 à 2013) *in vivo* chez l'animal et *in vitro* concernant les effets de 8 composés de la famille des phtalates (Tableau 19) sur l'appareil reproducteur femelle. Il contient en outre une analyse de l'ensemble des données concernant les effets de ces mêmes composés sur la fonction thyroïdienne pour la période 2011-2013.

L'analyse faite se limite aux monoexpositions.

		Nbre publis repro F	Nbre de publi thyroïde
Di-isodecylphtalate	CAS 26761-40-0/68515-49-1		
Di-n-pentylphtalate	CAS 131-18-0		
Dipropylphtalate	CAS 131-16-8	1 + 1 revue	
Di-n-hexylphtalate	CAS 84-75-3	1 revue	1 (2001)
Di-isononylphtalate	CAS 28553-12-0/68515-48		
Dipropylheptylphtalate	CAS 53306-540		
Di-isobutylphtalate	CAS 84-69-5	1 + 1(2008) +1revue	
Mono-n-butylphtalate	CAS 131-70-4	1	1 +3 humain
Diundecylphtalate	CAS 3648-20-2	1	
Ditridecylphtalate	CAS119-06-2	1	

**Tableau 19:** phtalates inclus dans l'analyse, bilan des publications disponible de 2011 à 2013 et de publications antérieures non référencées dans le rapport INSERM.

### Données *in vivo* (2011-2013)

**Diundecyl phtalate :** Une seule étude récente traite de la toxicité sur la fonction de reproduction chez la femelle *in vivo*. Des rates Sprague Dawley ont été traitées au DUDP à 0-0,25-0,5 et 1 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> du 6<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour de gestation par gavage. Les femelles gestantes ont été euthanasiées à 21 jours, l'utérus et les ovaires étaient collectés afin de déterminer le nombre de corps jaune, les pertes pré- et post-implantatoires, les résorptions foétales, le sex ratio des foetus, la distance anogénitale, anatomie des foetus. Les seules anomalies pertinentes d'un point de vue toxicologiques concernaient l'occurrence de cotes surnuméraires au niveau lombaire qui était augmentée à 0,5 et 1 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> par rapport au groupe contrôle mais ne dépassait les témoins historiques que pour les deux plus fortes doses. Sur la base d'une augmentation de la fréquence d'apparition d'une 14<sup>ème</sup> cote, la NOAEL serait de 0.25 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> et la LOAEL de 0.5 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> par voie orale.

**Di-n-propyl phtalate :** [5] : Des rates Sprague Dawley gestantes ont été gavées au Di-n-propyl phtalate de GD6 à GD20 aux doses de 0,5-1 et 1,5 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. Cette étude réalisée par la même équipe et portant sur les mêmes paramètres que pour le diundecyl phtalate présente de bonnes garanties. Des signes de toxicité générale chez les mères caractérisée par une diminution de gain de poids corporel entre GD6 et 9 et des modifications du poids et du bilan enzymatique hépatique : augmentation des ALAT dès la dose de 0,5 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, une augmentation du poids relatif du foie à 1 et 1,5 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, une augmentation de l'activité palmitoyl CoA oxydase dès 0.5 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> et. Chez les fœtus, une diminution du poids corporel était notée dans les deux sexes uniquement pour la plus forte dose la distance anogénitale des jeunes mâles (brute ou normalisé par la racine cubique du poids corporel) était diminuée à partir de la dose 1 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, chez les petites femelles, la distance anogénitale normalisée était légèrement mais significativement augmentée pour la plus forte dose. Aucun des autres paramètres gestationnels étudiés n'était modifié par l'exposition des mères. Les doses de 1 et 1,5 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> étaient associées à une augmentation significative de développement de cotes surnuméraires au niveau cervical et lombaire et la dose la plus forte était associée à une altération de l'ossification de l'os hyoïde. Les auteurs précisent que ce type de malformation peut être fréquent chez le rat, avoir un déterminisme varié (autres contaminants chimiques, stress maternel..) et que à l'état rudimentaire ou réversible ce type d'anomalie peut être considérée comme normale par rapport au processus développemental et se révèle le plus souvent sans incidence sur la santé.

**Di-isobutylphtalate :** Une seule étude postérieure à 2010 [8] est recensée et une étude de 2008 ([6] non citée dans le rapport INSERM, voir ci-dessus revue). L'étude réalisée en 2012 concerne des administrations intrapéritonéale de Di-isobutylphtalate en une unique injection à GD 10 ou 12 ou 14 aux doses de 0,375- 0,75-et 1,25 ml.kg<sup>-1</sup> (n=6/groupe) chez la rate Wistar. L'anatomie /histologie ovarienne était examinée sur les fœtus collectés à GD20 aucun autre paramètre reproductif n'a été analysé. L'article manque de précision dans la description du matériel et méthode, il est impossible de savoir combien de fœtus ont été collectés. Il semblerait qu'aucune analyse quantitative et statistique n'ait été faite. Les résultats se limitent à une description qualitative de l'histologie des ovaires fœtaux après coloration éosine hématoxyline. Les auteurs décrivent la survenue chez les animaux traités de follicules anormaux avec des ovocytes dégénérés (noyaux pycnotiques et irréguliers) ou pas d'ovocyte (follicules vides), une congestion des vaisseaux sanguins dans le stroma ovarien. Aucune analyse de l'intensité de ces effets en fonction de la dose et/ou du stade d'administration n'est faite bien que les micro-photographies produites semblent indiquer une certaine hétérogénéité de ces effets. Au bilan cette étude présente de sérieuses limites et une voie d'administration (ip) non compatible avec l'ERS. L'étude de Boberg et al. 2008 [6], non revue en détail ici serait bien plus adaptée.

## 3.6 Autres effets

### Effets sur la fonction thyroïdienne

**Principales conclusions de l'expertise collective de l'INSERM de 2011 sur la base des animales ou in vitro :**

D'autres organes que l'ovaire ou les testicules sont également des cibles potentielles comme l'hypophyse ou l'hypothalamus au niveau cérébral ou encore l'utérus et la glande mammaire comme en témoignent quelques études in vitro. »

### Données humaines

Une équipe taiwanaise [11] s'est intéressée dans la cadre d'un étude de cas cliniques liés à une contamination frauduleuse d'aliments pour enfants au DEHP et au **Di-isononyl phtalate** à la fonction thyroïdienne de ces enfants (60 cas éligibles dont 52 cas exposés, 35 expositions caractérisées, 22 suivi à 6 mois de la fonction thyroïdienne avec 19 cas exposés). Les enfants ont été classés en trois groupes selon leur niveau d'exposition possible (important n=29, faible n=23, nul n=8), sur la base du recueil commémoratif auprès des parents concernant l'ingestion des produits contaminés qui étaient bien répertoriés. Les effectifs restent faibles ce qui est d'autant plus gênant que certains paramètres au sein d'un même groupe présentent une variabilité assez importante. Par exemple, la proportion de garçons était plus importante dans tous les groupes, l'écart type sur le poids corporel ou l'âge des patients pouvait atteindre 50% de la valeur moyenne. Aucun de ces paramètres ne différait entre les différents groupes. En revanche la variabilité des paramètres hormonaux et biochimiques investigués était beaucoup plus faible. Au bilan un effet significatif de l'exposition était noté au niveau des concentrations sériques en TSH qui étaient plus faibles chez les exposés que chez les contrôles (-42% sur la valeur moyenne, p=0.011) et une diminution de la proportion d'enfants présentant des taux d'œstradiol inférieure à 8 pg/ml dans un prélèvement ponctuel pour le lot catégorisé en forte exposition. Aucun autre paramètre de la fonction thyroïdienne n'était significativement affecté par la catégorie d'exposition. Sur les 35 enfants sur lesquels l'exposition a pu être estimée suffisamment précisément, l'apport journalier en DEHP et DINP a été respectivement estimé de 0.0028 à 0.1874 mg/kg/j et de 0,06970 à 3.098 mg/kg/j. Une étude de corrélation entre les expositions et la TSH ou l'œstradiol a été conduite par les auteurs mais uniquement pour l'exposition au DEHP, il est donc impossible de déterminer la part du DiNP dans les effets observés. Sous réserve de relecture par un expert plus compétent, il semble difficile de retirer une conclusion de l'analyse de cette publication quand à un effet possible du DiNP sur la fonction thyroïdienne chez l'homme.

Une étude conduite chez des enfants danois pré-pubères (âge moyen 7 ans) en bonne santé [12] visait à caractériser les fonctions thyroïdiennes et somatotrope en lien avec les données de concentrations urinaires en différents monoester-phtalates et/ou leurs métabolites dont le **mono-n-butyl phtalate** (MnBP). Une corrélation négative entre les concentrations sériques en T3 totale et le MBP urinaire a été observée, elle n'est significative que chez les filles et une corrélation négative avec la T3 libre significative chez les garçons a également été observée. Aucune corrélation significative entre le MBP urinaire et les concentrations sanguines en Igf-1 n'a été observée. En ce qui concerne la fonction thyroïdienne des corrélations similaires ont été observées pour d'autres phtalates que le MBP. Les auteurs concluent qu'il existe une association négative entre l'exposition aux phtalates (sans plus de précision) et la fonction thyroïdienne et dans certains cas l'IGF et émettent l'hypothèse que cela pourrait avoir des conséquences sur les performances de croissance. Cette dernière hypothèse est difficile à comprendre dans le contexte de cette étude dans la mesure où la population d'enfants inclus dans l'étude était très homogène en termes de BMI, poids, taille.

L'étude de Meeker sur la cohorte NHANES 2007-2008 [13] a investigué les relations possibles entre BPA et phtalates urinaires et paramètres de la fonction thyroïdienne (total T4, T4 libre, TSH total T3, T3 libre, thyroglobuline). Parmi tous les phtalates et métabolites pris en compte dans cette étude seul le **mono-n-butyl phtalate** rentre dans le cadre de ce rapport. Aucune association significative entre les concentrations urinaires en MnBP et paramètres de la fonction thyroïdienne n'a été mise en évidence et ce quelque soit le mode d'ajustement des données (prise en compte ou non de la stratégie de prélèvement pour caractériser les concentrations urinaires) et/ou la classe d'âge considérée (adulte vs adolescent).

Les données de Boas *et al.* (2010) chez les jeunes enfants et celles de Meeker *et al.* (2011) sur des adultes et adolescents semblent diverger en termes d'association possible entre exposition au MnBp et fonction thyroïdienne. Cependant, il convient de noter que ces études s'adressent à des situations physiologiques très différentes notamment en termes de sollicitation potentielle de la fonction thyroïdienne et ceci pourrait en partie expliquer ces divergences.

Une dernière étude chez l'homme, s'intéressant entre autre au MnBP, explore la relation possible entre hypothyroïdie congénitale et l'exposition à différents PE [14]. Cette étude est construite sur un protocole de type cas (n=39)-témoin (n=20). Les concentrations sériques en contaminant ont été déterminées chez les mères et chez les enfants entre 1 et 54 mois ce qui laisse supposer qu'elles puissent ne pas être représentatives de l'exposition au cours des phases critiques de l'ontogénèse de la fonction thyroïdienne. Dans ces conditions, cette étude ne met pas en évidence de relation entre concentration sanguine en MnBP chez la mère ou chez l'enfant et diagnostic d'hypothyroïdie congénitale. L'étude ne comporte aucune donnée permettant d'évaluer l'adéquation des apports en iode dans les deux groupes et donc d'éventuels biais d'interprétation liés à une insuffisance d'apport en iode.

### **Données chez l'animal**

Pour les phtalates ciblés dans le cadre de ce rapport et pour la période d'intérêt une seule publication a été recensée. Cette étude porte sur un modèle de Xénope et sur le Di-n-butyl phtalate et le Mono-n-butyl phtalate. Cette étude montre un effet négatif du MnBP sur les processus développementaux associés à la métamorphose du têtard dès 10 mg/l dans le milieu d'élevage et relie ces effets à une diminution de l'expression de gènes cibles des hormones thyroïdiennes dont les gènes codant pour le TR $\beta$  et RXR $\gamma$  (à partir de 2 mg/L) et une augmentation de l'expression des gènes codant pour la sous unité TSH $\beta$  normalement sous rétrocontrôle négatif des hormones thyroïdiennes au niveau de la tête. D'un point de vue mécanistique, les auteurs expliquent ces modifications par une augmentation de la co-répresseur des récepteurs des hormones thyroïdiennes de la famille des SMRT. Cette étude met en évidence des voies mécanistiques possibles pour une action du MnBP sur la fonction thyroïdienne dans une espèce modèle de référence en matière de régulation thyroïdienne.

## **Autres effets – Métabolisme - Obésité**

### Récapitulatif de synthèse ou expertise préalable

L'expertise collective INSERM "Reproduction et Environnement" (2011) ne s'est pas attaché à étudier les effets sur l'obésité et le métabolisme en tant que tel. Celle-ci a toutefois traité des interactions des phtalates avec les récepteurs PPAR (pour peroxyosome proliférateur activé récepteur).

Il s'agit ici de définir si les phtalates exercent un effet délétère sur la survenue de troubles métaboliques, tels que l'obésité, l'insulino-résistance et le diabète de type 2. Les phtalates étant des activateurs des récepteurs PPAR (peroxyosome proliférateur-activé récepteur), les tissus cibles des phtalates sont donc les tissus qui expriment ces récepteurs, et notamment le tissu adipeux et le foie. Or, les PPAR sont des récepteurs nucléaires qui agissent comme des facteurs de transcription activant un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme et l'obésité. Ainsi, PPARalpha promeut l'oxydation des acides gras et aura donc une action hypolipémiante présente dans le foie et le muscle. Au contraire, PPARgamma a une action prépondérante dans le tissu adipeux et stimule le stockage des acides gras et la différenciation adipocytaire. Il est donc légitime de s'interroger sur le potentiel obésogène des phtalates.

Les différents articles qui sont discutés ci-après traitent soit du DEHP si les doses utilisées sont inférieures au NOAEL (5 mg/kg/jour) soit des phtalates autres que le DEHP (cf. composés listés dans le chapitre contexte 1.1 non soumis à des restrictions d'usage pour certains d'entre eux). Les tissus cibles étudiés dans les études expérimentales sont le foie et le tissu adipeux.

### **Données humaines**

Les études épidémiologiques n'ont pas été évaluées. Seules les références de ces études sont citées.

### **Données *in vitro***

*In vitro*, plusieurs études ont étudié l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans un modèle murin de cellules adipocytaires 3T3-L1 (Pereira-Fernandes *et al.*, 2013 ; Hao *et al.*, 2012 ; Taxvig *et al.*, 2012) mais également dans un modèle de lignées humaines d'adipocytes Ellero-Simatos *et al.*, 2011) en réponse à une exposition aux phtalates. L'accumulation de gouttelettes lipidiques atteste de la différenciation en adipocytes matures capables de lipogénèse. D'autres marqueurs de différenciation peuvent avoir été suivis. Ce sont des études de bonne qualité soucieuses de standardisation avec utilisation de témoins positifs (rosiglitazone, troglitazone ou tributylétain), de plusieurs doses de MEHP (tous sauf Ellero-Simatos *et al.*, 2011), et de plusieurs phtalates (BBP, DBP, DiBP et DiNP) dans Pereira-Fernandes *et al.*, 2013.

Les conclusions de ces 4 études *in vitro* montrent que le MEHP est un activateur de la lipogénèse via PPARgamma dans les lignées de cellules adipocytaires (murines et humaines) ; ce qui *in vivo* signifie un potentiel obésogène. Les effets sont dépendants de la dose dans les papiers où différentes doses ont été regardées. Le BBP est un obésogène fort et le DiNP est un obésogène faible en comparaison de la rosiglitazone ou du TBT.

## Données in vivo

Les études *in vivo* reviewées sont très différentes dans leurs protocoles expérimentaux en comparaison des études *in vitro*. Une étude de Hao *et al.* (2012) montre qu'une exposition à de faibles doses de MEHP (0,05, 0,25 et 0,5 mg/kg/jour) par gavage entre le J8 embryonnaire et le J14 post-natal se traduit dans la descendance mâle par une augmentation du poids à 8 semaines d'âge à la plus faible dose en relation avec une action au niveau du tissu adipeux : augmentation de l'expression de PPARgamma dans le tissu adipeux (mais pas le foie) et qui se traduit par une augmentation du tissu adipeux périépididymal, probablement à l'origine de l'augmentation de la concentration sérique en triglycérides, en cholestérol et d'une hyperglycémie. En revanche, l'expression de PPARalpha dans le foie (mais pas dans le tissu adipeux) est augmentée de façon significative et dose-dépendante. Aucun gène de la beta-oxydation n'a été suivi. Aucun effet n'est observé dans la descendance femelle. Par ailleurs, lorsqu'une exposition unique en intra-péritonéale est réalisée sur des souris mâles adultes à la dose de 0,5 mg/kg, l'expression de PPARgamma est induite dans le foie et le tissu adipeux à des taux équivalents à la même dose de troglitazone.

Les études de Feige *et al.*, 2010 ont montré qu'une exposition à des doses élevées de DEHP (100 ou 1000 mg/kg/jour de 4 à 17 semaines d'âge) entraînait une activation majeure de PPARalpha au niveau hépatique et se traduisait par une activité catabolique importante puisque les souris ne prenaient pas de poids en réponse à un régime gras. Pour réconcilier les 2 études, il est possible que dans Hao *et al.* (2012), l'activation de PPARalpha ne soit pas suffisante pour opposer l'induction génique de ppar gamma dans le tissu adipeux.

Une autre étude *in vivo* (Migliarini *et al.*, 2011) propose que le cerveau est également une cible des phtalates. Le modèle expérimental est celui du zebrafish et l'expression de PPARalpha et de SREBP (sterol regulatory element binding protein), un facteur de transcription impliqué dans la lipogénèse dans le foie et de gènes orexigéniques dans le cerveau ainsi que la prise alimentaire sont rapportées en conditions d'expositions à 3 doses de DEHP différentes. Des expériences complémentaires sont attendues mais les auteurs suggèrent un effet négatif sur la stimulation de l'appétit associé à un effet obésogène. Selon le marqueur étudié, les effets augmentent (SREBP) ou diminuent (PPARalpha) avec la dose de DEHP.

Deux autres études abordent les effets cocktails, l'une (Naville *et al.*, 2013) avec des doses très faibles (DJA pour le DEHP) en chronique depuis la préconception de la mère et l'autre (Manikkam *et al.*, 2013) avec des doses très fortes dans laquelle il s'est agi d'étudier la génération F3 quand seule la génération F1 est exposée. Précisément, dans Naville *et al.*, 2013, le travail est réalisé sur des souris soumises à un régime riche en gras et en sucres additionné ou non d'un cocktail de 4 polluants (BPA, PCB153, TCDD et DEHP) chacun ajouté à une dose de l'ordre de la DJA (et 50 microgr/g pour le DEHP=TDI). Le régime est commencé 4 semaines avant la mise au mâle, et il est poursuivi dans la descendance qui est étudiée à 12 semaines. Les résultats mettent en évidence une absence de modification de la prise pondérale ou de paramètres métaboliques comme glycémie, insulïnémie, TG plasmatiques etc.. Cependant une aggravation de l'intolérance au glucose est observée dans la descendance femelle. Au niveau du foie, il est observé une altération de la signalisation estrogénique chez la femelle avec l'induction de la Sult1e1, une sulfotransférase qui conjugue les estrogènes. Or, les estrogènes protègent de l'insulino-résistance mais pas les estrogènes conjugués puisqu'ils ne peuvent pas lier leurs récepteurs. L'hypothèse est donc posée d'un lien entre l'intolérance au glucose et l'induction hépatique de Sult1e1. Chez les mâles, une induction de la voie de biosynthèse du cholestérol et de son efflux est observée.

Dans le contexte de cette revue sur les phtalates, il faut bien noter que dans l'étude de Naville *et al.*, (2013), les animaux sont exposés à un mélange. Cette étude constitue ainsi une preuve de concept que de faibles doses de polluants de l'ordre des doses considérées



sans effet pour l'homme ne sont en fait pas sans effet lorsque l'exposition est chronique et que les polluants sont administrés en mélange dans un contexte d'obésité provoquée par une alimentation enrichie en calories. Cependant on ne peut pas conclure sur l'effet DEHP. On peut également préciser qu'il n'y a pas eu d'effet obésogène démontré puisque les animaux n'ont pas pris de poids et qu'il n'y a pas eu non plus de modifications dans les poids des tissus adipeux périgonadiques.

Dans le travail du groupe de Skinner, on s'intéresse aux conséquences notamment métaboliques (obésité) sur la F3 d'une exposition faite sur la F1 pendant la vie foetale (E8-E14) à un mélange de BPA (50 mg/kg), DEHP (750 mg/kg), DBP (66 mg/kg) appelé « plastics » ou la moitié de ces doses (« lower doses »). En parallèle de l'identification du phénotype des animaux F3 (recherche systématique d'anomalies de reproduction ou métaboliques), les auteurs étudient en particulier l'épigénôme du sperme et recherchent l'existence de zones différenciellement méthylées entre « F3 issus de F1 exposés » et « F3 issus de F1 non-exposés ».

Par rapport aux anomalies métaboliques, les auteurs notent qu'alors que les F1 ont un poids normal, environ 5 femelles et 5 mâles F3 de la « lower dose » sur la cinquantaine d'animaux/sexe présentent une obésité (+10%). En parallèle, les auteurs identifient 197 régions différenciellement méthylées entre « F3 issus de F1 exposés » et « F3 issus de F1 non-exposés » notamment au niveau des promoteurs de gènes connectés avec l'obésité (Tnfrsf12a, Esrra, Fgf19, Wnt10b, Gdnf).

Normalement, toutes les marques épigénétiques sont effacées au moment de la fertilisation pour une « remise à zéro » du génôme de l'embryon à l'exception des gènes soumis à empreinte. Les auteurs considèrent donc que l'exposition a modifié le cycle des marques de méthylation et que les gènes qui se sont trouvés altérés échappent dans les générations suivantes aux cycles de méthylation-déméthylation c'est-à-dire qu'ils se comportent globalement comme les gènes soumis à empreinte.

La conclusion de ces études *in vivo* suggèrent qu'une revue de la littérature exhaustive devra être réalisée pour préciser le potentiel obésogène des phtalates mais également l'impact sur la survenue d'autres troubles métaboliques. Enfin, l'étude de Hao et de Skinner laissent à penser qu'il pourrait y avoir des effets à distance à l'âge adulte après une exposition néonatale, il s'agit de l'effet DOHaD pour Developmental origins of human adult diseases, et même après plusieurs générations signifiant une modification transgénérationnelle de l'épigénôme. Certainement, ces pistes doivent être explorées pour confirmer ou infirmer ces résultats originaux.

## **Autres effets – PPAR**

Récapitulatif de synthèse ou expertise préalable :

L'expertise collective INSERM "Reproduction et Environnement" (2011) indique à propos des mécanismes d'action des phtalates que le DEHP et son métabolite le MEHP, le BBP, le dibutylbenzyl-phtalate (DBBP) et le DIBP sont capables d'interagir avec les récepteurs nucléaires PPAR (pour peroxysome proliferator activated receptor). Elle précise que le MEHP est un agoniste partiel de PPAR $\gamma$  et que son activité est plus faible sur le PPAR $\gamma$  de souris que sur le PPAR $\gamma$  humain. Cette expertise souligne également que le récepteur PPAR $\alpha$  est lui aussi une cible du MEHP, avec comme pour PPAR $\gamma$ , des effets différents selon qu'il s'agit de PPAR $\alpha$  murin ou humain.

### **Données chez l'animal**

Plusieurs travaux, portant majoritairement sur le DEHP ou son métabolite le MEHP, ont été publiés depuis (Hayashi 2011; Ito et al., 2012; Taxvig et al., 2012; Pereira-Fernandes et al., 2013). Ils confirment, grâce à l'utilisation de modèles cellulaires, ou d'animaux transgéniques que PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  sont bien des cibles des phtalates, suggérant un effet possible de ces contaminants sur l'homéostasie lipidique et/ou l'inflammation. Les données recueillies à ce jour sur l'interaction phtalates-récepteurs PPAR sont très fragmentaires ou inexistantes pour les phtalates autres que le DEHP, il est donc difficile d'établir des comparaisons entre les différents esters de l'acide phtalique aujourd'hui commercialisés. Néanmoins, une étude récente (Sarath Josh et al., 2013), basée sur des approches *in silico*, tente de comparer les affinités de plusieurs phtalates avec les récepteurs PPAR $\alpha$  et  $\gamma$  humains. Elle montre que c'est le DIDP qui est susceptible de présenter la plus forte affinité pour PPAR $\gamma$ . Les dérégulations métaboliques que les phtalates sont susceptibles de provoquer dépassent une évaluation des dangers centrée sur la reproduction. La littérature croissante publiée sur ce type d'effet mériterait néanmoins d'être prise en compte dans le cadre d'une évaluation plus large des effets des phtalates sur la santé.

## **Autres effets – cancer du sein :**

### **Données humaines**

**Lopez-Carillo L., et al. , EHP, 2010. / Breast Cancer**

#### **Design**

Etude cas-témoins (population based) de mars 2007 à août 2008, Mexique.

233 Cas identifiés dans 25 hôpitaux / diagnostics histologique sans stade - > 18 ans.

221 Témoins identifiés sur liste domicile / appariés sur âge et lieu de résidence.

#### **Modalités**

1. Questionnaires remplis par entretiens directs (taux de réponses entre 95 et 99%).
2. 1 prélèvement urinaire du matin dans un récipient en polypropylène, avant tout type de traitement.
3. Dosages de MEP, MBP, MiBP, MBzP, MCPP, et 4 métabolites du DEHP : MEHP, MEHHP, MEOHP, et MECPP.
4. Analyses statistiques : dosages ajustés sur créatinine, utilisation de tertiles, de la somme des métabolites du DEHP, du statut ménopausique, analyse de tendances.

#### **Résultats**

3. Données conformes aux données de la littérature sur facteurs de risques du cancer du sein (parité, allaitement, date du premier enfant, BMI).
4. MEP : 170 (cas) versus 107 (témoins) – $p=0.001$  // MBP : 63(cas) versus 82 (témoins) – $p=0.01$  // DOP non renseigné sur les dosages et indiqué dans le texte ?
5. Breast cancer : DEP/MEP 2.20 (1.3-3.6) –  $p=0.003$  (analyse premier versus troisième tertile) // BBzP/MBzP 0.46 (0.3-0.8) -  $p=0.008$ .

### Conclusions des auteurs

1. Association (+) BC et DEP (combinée pour les femmes pré et post-ménopausées) et (-) BC et MBzP.
2. Limite liée à une seule mesure urinaire des phtalates.
3. Nombre faible de femmes inclus dans l'analyse du statut ménopausique.
4. Pas de signification retrouvée pour DEHP.

### En conclusion

- *Etude à considérer – méthodologie ad hoc.*
- *Faible niveau de preuve (faible nombre de personnes incluses – un seul dosage – données incomplètes sur DOP - signification statistique uniquement obtenue sur tertiles).*

## 4 Discussion – Perspectives

Au vu des éléments rassemblés dans ce rapport intermédiaire, certaines recommandations peuvent d'ores et déjà être émises, notamment en termes d'acquisition de connaissances en vue de l'évaluation de risques pour la santé humaine.

- Les phtalates constituent une famille de composés présentant des propriétés physico-chimiques différentes.

Les phtalates sont utilisés dans la fabrication de certains produits de consommation, notamment dans les produits utilisant des matières plastiques comme le PVC. Un intérêt croissant pour les phtalates à longue chaîne (supérieure à 7 atomes de carbone) peut être observé. En effet, des données récentes montrent une diminution importante de l'usage des phtalates à chaîne courte, pour lesquels la réglementation a conduit à des restrictions d'usage au niveau européen dans les produits au cours des dernières années. Les phtalates à chaîne longue, encore peu soumis à des restrictions induites par la réglementation, semblent ainsi constituer à ce jour une alternative aux composés à chaîne courte.

En France, l'étude de filières a montré :

- pour les phtalates à chaîne courte : aucun usage spécifique n'a été identifié pour le Mono-n-butyl phtalate (MnBP), dipropylphtalate (DPP) di-n-hexylphtalate (DnHP), di-n-pentylphtalate (DnPP). A noter que le Mono-n-butyl phtalate (MnBP) est un métabolite biologique du DBP et du BBP, ce qui explique qu'aucun usage n'a été identifié pour ce composé lors de l'étude de filières. Concernant le Di-(2-ethylhexyl)phtalate (DEHP), le dibutylphtalate (DBP), di-isobutylphtalate (DIBP) et le butylbenzylphtalate (BBP) : ces substances sont majoritairement utilisées, d'après les réponses des industriels à l'enquête de filières, en tant que plastifiants, qui par la suite sont mis en œuvre dans différents articles en caoutchouc, des colles, des aménagements intérieurs (revêtement de sol et de mur, câbles, rideaux de douches, tissus enduits..) des poches plastiques, des couvertures d'agendas. ...
- pour les phtalates à chaîne longue : plusieurs usages ont été identifiés pour le di-isononylphtalate (DINP), le di-isodecylphtalate (DIDP) et le di-propylheptylphtalate (DPHP). Ils sont notamment utilisés dans le caoutchouc, et dans de nombreux autres secteurs d'activités et usages (colles, mastics etc.).

Il conviendrait de confirmer cette tendance par une étude de filières mise à jour et portant plus spécifiquement sur les composés pour lesquels peu d'informations sont disponibles.

A noter qu'il est difficile d'obtenir des informations spécifiques sur les usages des phtalates d'autant plus que plusieurs phtalates peuvent être utilisés dans un même produit.

- **En termes d'exposition**, les données déjà disponibles ou en cours d'acquisition permettront, pour certains composés de la famille des phtalates, de savoir s'ils sont présents ou non dans les aliments ainsi que dans les EDCH. **Les résultats des études en cours permettront de mieux quantifier l'exposition d'origine alimentaire dont l'eau de consommation.** Cependant, un certain nombre de phtalates de nouvelle génération n'ont pas fait l'objet de ce type d'étude. L'unité d'évaluation des risques liés à l'eau et le laboratoire d'hydrologie de Nancy mènent des travaux afin de caractériser les teneurs en phtalates dans les eaux

distribuées et les eaux embouteillées au niveau national. Ces travaux feront l'objet d'une validation par le CES Eaux au cours du premier trimestre 2014.

Pour les médias air et poussières au sol, il existe des données françaises dans les logements et les écoles pour le BBP, le DBP, le DEHP, le DiBP et le DiNP. Le di-éthylphtalate (DEP), le di-méthylphtalate (DMP) et le di-méthyléthylphtalate (DMEP) (non ciblés dans la saisine) ont également été mesurés dans ces études. D'autres études en cours permettront de disposer, d'ici 2015-2016, de données d'exposition à ces phtalates à l'échelle du parc des résidences principales d'une part, et du parc des écoles maternelles et élémentaires d'autre part (France métropolitaine dans les deux cas). Par ailleurs, peu de données de contamination dans l'air extérieur ont été identifiées dans la littérature. En France, deux études (de la même équipe) présentant des résultats de mesure pour le DBP, le BBP et le DEHP à Paris sont disponibles.

Pour les phtalates n'ayant pas fait l'objet de mesures dans ces milieux en France :

- Compte tenu du peu d'informations obtenues lors de l'enquête de filières pour le DnPP, le DnHP, le DPP, et le DPHP, il conviendrait de confirmer l'utilisation de ces substances en France, afin d'évaluer le besoin d'acquérir des données d'exposition. Cette recommandation s'applique également aux phtalates n'ayant pas fait l'objet d'une étude de filières (DiUP, DCHP, DiOP et DTDP).
- Concernant le DiDP, des mesures dans l'air et les poussières en France peuvent d'ores et déjà être recommandées au regard des résultats de l'enquête de filières.
- **Dans l'attente de disposer de mesures françaises**, il pourrait être envisagé d'évaluer la qualité des études disponibles dans les autres pays et la possibilité d'extrapoler leurs résultats à la situation française, en vue de leur utilisation pour de futurs travaux.

Au-delà des substances évaluées dans le cadre de ces travaux, il apparaît nécessaire d'acquérir des connaissances plus larges sur l'exposition de la famille phtalates en général. Le développement analytique de méthodes multi-résidus dans l'air et les poussières est à privilégier.

- Certains de ces composés pouvant générer des métabolites communs, le suivi de ces composés à travers les études de biomonitoring peut s'avérer complexe.
- L'ensemble des données d'exposition devrait **permettre d'identifier les populations à risque**, par exemple les individus avec des comportements, des habitudes alimentaires ou un travail à risque.
- **En termes d'imprégnation de la population française**, si le volume de données disponibles paraît relativement important pour le DEHP, DBP etc, il est proposé **une meilleure caractérisation de cette classe de substances dans toute sa diversité, depuis les formulations techniques jusqu'aux produits de dégradation de ceux-ci**, afin d'appréhender cette famille de contaminants dans toute sa complexité.
- **En termes de toxicité**, comparativement aux composés à chaînes courtes (<C8), les substances à longues chaînes sont généralement considérées moins toxiques alors que peu d'études documentent leurs effets sur l'environnement et sur l'Homme. Les données sont encore largement insuffisantes dans ce domaine. **Il conviendrait de suivre les publications à venir concernant la toxicité de ces composés.**
- **Concernant les études expérimentales**, les études récentes relatives aux effets des phtalates sur l'appareil reproducteur mâle soulèvent certaines questions :

- Alors que les valeurs toxicologiques de référence des phtalates sont souvent fondées sur l'effet anti-androgénique de ces produits chez le fœtus de rat mâle, un nombre croissant de données récentes suggèrent que l'activité androgénique du testicule fœtal n'est pas affectée par les phtalates chez l'homme. Cela interroge sur la pertinence de l'extrapolation à l'Homme des données expérimentales obtenues chez le rat.
- Si la réponse des cellules de Leydig aux phtalates, est hautement variable d'une espèce à l'autre, en revanche la plupart des études convergent pour montrer un effet délétère de ces produits sur le compartiment séminifère chez le fœtus. L'induction par les phtalates de l'apoptose des gonocytes a été observée chez l'Homme, le rat et la souris. La formation de gonocytes multinucléés en fin de vie fœtale chez le rat et la souris a également été retrouvée dans l'espèce humaine à une période de développement comparable (2<sup>e</sup> semestre de grossesse). La diminution de l'expression de l'AMH en réponse aux phtalates est également un end-point commun au rat et à l'espèce humaine. Cependant, les études de l'altération du compartiment séminifère du testicule fœtal dans l'espèce humaine sont encore très peu nombreuses et il reste difficile de standardiser les endpoints séminifères. Enfin, puisque les cellules de Sertoli sont très probablement la cible primaire des phtalates dans le testicule fœtal, il conviendrait d'établir une liste de gènes dont l'expression est systématiquement modifiée chez le rat, la souris et l'Homme.
- La revue des études *in vivo* sur l'impact possible des phtalates sur l'obésité et le métabolisme suggèrent qu'une revue de la littérature exhaustive devra être réalisée pour préciser le potentiel obésogène des phtalates mais également l'impact sur la survenue d'autres troubles métaboliques. Enfin, les études de Hao *et al.* (2012) et de Skinner laissent à penser qu'il pourrait y avoir des effets à distance à l'âge adulte après une exposition néonatale, il s'agit de l'effet DOHaD (Developmental origins of human adult diseases), et même après plusieurs générations signifiant une modification transgénérationnelle de l'épigénôme. Certainement, ces pistes doivent être explorées pour confirmer ou infirmer ces résultats originaux.
- Etant donné l'exposition ubiquitaire à ces composés, il conviendrait de réfléchir à la prise en compte des effets liés à une exposition combinée à plusieurs de ces substances.

## 5 Bibliographie

- Adamo C, Antignac JP, Auger J, Balaguer P, Bourc'his D, Bujan L, Chevrier C, Cotinot C, Cravedi JP, Laudet V, Livera G, Slama R (2011) Expertise collective INSERM. Reproduction et Environnement, éditions Inserm, Paris, 713 p.
- Adibi JJ, Perera FP, Jedrychowski W, Camann DE, Barr D, Jacek R, Whyatt RM (2003) Prenatal exposures to Phthalates among women in New York and Krakow, Poland. *Environmental Health Perspectives* 111, 1719-1722.
- Adibi JJ, Whyatt RM, Williams PL, Calafat AM, Camann D, Herrick R, Nelson H, Bhat HK, Perera FP, Silva MJ, Hauser R (2008) Characterization of phthalate exposure among pregnant women assessed by repeat air and urine samples. *Environmental Health Perspectives* 116, 467-473.
- Albert O, Jegou B (2013) A critical assessment of the endocrine susceptibility of the human testis to phthalates from fetal life to adulthood. *Hum Reprod Update* Sep 29. [Epub ahead of print].
- Barlow NJ, Foster PM. Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Pathol.* 2003;31:397–410.
- Beydon, D., Payan, J. P., and Grandclaude, M. C. (2010). Comparison of percutaneous absorption and metabolism of di-n-butylphthalate in various species. *Toxicol In Vitro* 24(1), 71-78.
- Boas, M., et al., Childhood exposure to phthalates: associations with thyroid function, insulin-like growth factor I, and growth. *Environ Health Perspect*, 2010. 118(10): p. 1458-64.
- Boberg, J., et al., Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology*, 2008. 250(2-3): p. 75-81.
- Borch J, Metzдорff SB, Vinggaard AM, Brokken L, Dalgaard M. (2006) Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology* 223:144–55.
- Burgess-Herbert, S. L., and Euling, S. Y. (2013). Use of comparative genomics approaches to characterize interspecies differences in response to environmental chemicals: challenges, opportunities, and research needs. *Toxicol Appl. Pharmacol* 271(3), 372-385.
- Bustamente-Montes LP, Hernández-Valero MA, Garcia- Fabila M, Halley-Castillo E, Karam-Calderon MA, Borja- Aburto VH (2008) Prenatal phthalate exposure and decrease in anogenital distance in Mexican male newborns. *Epidemiology* 19:S270.
- Cahill, T. M., Cousins, I., and Mackay, D. (2003). Development and application of a generalized physiologically based pharmacokinetic model for multiple environmental contaminants. *Environ Toxicol Chem* 22(1), 26-34.
- Chang, L. W., Hou, M. L., and Tsai, T. H. (2013). Pharmacokinetics of Dibutyl Phthalate (DBP) in the Rat Determined by UPLC-MS/MS. *Int. J. Mol. Sci.* 14(1), 836-849.
- Chang-Liao, W. L., Hou, M. L., Chang, L. W., Lee, C. J., Tsai, Y. M., Lin, L. C., and Tsai, T. H. (2013). Determination and pharmacokinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats by ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Molecules.* 18(9), 11452-11466.
- Chauvigné F, Menuet A, Lesné L, Chagnon MC, Chevrier C, Regnier JF, Angerer J, Jégou B. (2009) Time- and Dose-Related Effects of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and its Main Metabolites on the Function of the Rat Fetal Testis in vitro. *Environ Health Perspect* 117:515-21.
- Chou YY, Huang PC, Lee CC, Wu MH, Lin SJ. Phthalate exposure in girls during early puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2009, 22 : 69-77.
- Chu, D.P., et al., Exposure to mono-n-butyl phthalate disrupts the development of preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev*, 2012.
- Chu, D.P., et al., Abnormality of maternal-to-embryonic transition contributes to MEHP-induced mouse 2-cell block. *J Cell Physiol*, 2013. 228(4): p. 753-63.
- Cobellis L, Latini G, De Felice C, Razzi S, Paris I, et coll. High plasma concentrations

of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2003, 18 : 1512-1515.

Colon I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect* 2000, 108 : 895-900

Christiansen S, Boberg J, Axelstad M, Dalgaard M, Vinggaard AM, Metzdorff SB, Hass U (2010) Low-dose perinatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate induces anti-androgenic effects in male rats. *Reprod Toxicol* 30:313-21.

Clewell, R. A., Kremer, J. J., Williams, C. C., Campbell, J. L., Jr., Andersen, M. E., and Borghoff, S. J. (2008). Tissue exposures to free and glucuronidated monobutylphthalate in the pregnant and fetal rat following exposure to di-n-butylphthalate: evaluation with a PBPK model. *Toxicol Sci.* 103(2), 241-259.

Culty M, Thuillier R, Li W, Wang Y, Martinez-Arguelles DB, Benjamin CG, Triantafilou KM, Zirkin BR, Papadopoulos V (2008) In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. *Biol Reprod* 78:1018-28.

Delbès G, Levacher C, Habert R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* 2006; 132:527-38.

Dirtu ac et al., 2013. Phthalate metabolites in obese individuals undergoing weight loss... » PMID 23892227.

Doan, K., Bronaugh, R. L., and Yourick, J. J. (2010). In vivo and in vitro skin absorption of lipophilic compounds, dibutyl phthalate, farnesol and geraniol in the hairless guinea pig. *Food Chem Toxicol* 48(1), 18-23.

Do RP, Stahlhut RW, Ponzi D, Vom Saal FS, Taylor JA (2012) Non-monotonic dose effects of in utero exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on testicular and serum testosterone and anogenital distance in male mouse fetuses. *Reprod Toxicol* 34:614-21.

Durmaze E, Özmert EN, Erkekölür P, Giray B, Derman O, et coll. Plasma phthalate levels in pubertal gynecomastia. *Pediatrics* 2010, 125 : e122-e129

Duty SM, Singh NP, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, et coll. The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environ Health Perspect* 2003a, 111 : 1164-1169

Duty SM, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, et coll. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* 2003b, 14 : 269-277

Duty SM, Calafat AM, Silva MJ, Ryan L, Hauser R. Phthalate exposure and reproductive hormones in adult men. *Hum Reprod* 2005, 20 : 604-610.

Ellero-Simatos S et al., 2011. Combined transcriptomic- HNMR Metabonomic study reveals that MEHP stimulates adipogenesis and glyceroneogenesis in human adipocytes, PMID 22017230.

Ferrara D, Hallmark N, Scott H, Brown R, McKinnell C, Mahood IK, Sharpe RM (2006) Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology* 147:5352-62.

Fisher (2004) Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction* 127:305-15.

Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM (2003) Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model based on in utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 18:1383-94.

Frederiksen et al 2011. Urinary excretion of PM in 129 healthy Danish children and adolescents: estimation of daily phthalate intake" PMID21429484.

Gaido KW, Hensley JB, Liu D, Wallace DG, Borghoff S, Johnson KJ, Hall SJ, Boekelheide K (2007) Fetal mouse phthalate exposure shows that gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci* 97:491-503.

Ge RS, Chen GR, Tanrikut C, Hardy MP (2007) Phthalate ester toxicity in Leydig cells: developmental timing and dosage considerations. *Reprod Toxicol* 23:366-73.



- Gray LE Jr, Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, Howdeshell K, Ankley GT, Guillette L (2006) Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *Int J Androl* 29 : 96-104.
- Gray LE, Barlow NJ, Howdeshell KL, Ostby JS, Furr JR, Gray CL (2009). Transgenerational effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate in the male CRL: CD(SD) rat: added value of assessing multiple offspring per litter. *Toxicol. Sci.* 110, 411-25.
- Gray LE, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L, Veeramachaneni DN, Wilson V, Price M, Hotchkiss A, Orlando E, Guillette L (2001) Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum Reprod Update.* 7:248-64.
- Habert R, Devif I, Gangnerau MN, Lecerf L (1991) Ontogenesis of the in vitro response of rat testis to gonadotropin-releasing hormone. *Mol Cell Endocrinol* 82:199-206.
- Han SW, Lee H, Han SY, Lim DS, Jung KK, et coll. An exposure assessment of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in human semen. *J Toxicol Environ Health A* 2009, 72 : 1463-1469.
- Hao C et al., 2012. The MEHP promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice, PMID 22953781.
- Hauser R. Urinary phthalate metabolites and semen quality : a review of a potential biomarker of susceptibility. *Int J Androl* 2008, 31 : 112-117
- Hauser R, Calafat AM. Phthalates and human health. *Occup Environ Med* 2005, 62 : 806-818
- Hauser R, Meeker JD, Duty S, Silva MJ, Calafat AM. Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Epidemiology* 2006, 17 : 682-691
- Hauser R, Meeker JD, Singh NP, Silva MJ, Ryan L, et coll. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum Reprod* 2007, 22 : 688-695.
- Heger NE, Hall SJ, Sandrof MA, McDonnell EV, Hensley JB, McDowell EN, Martin KA, Gaido KW, Johnson KJ, Boekelheide K (2012) Human fetal testis xenografts are resistant to phthalate-induced endocrine disruption. *Environ Health Perspect* 120:1137-43.
- Herr C, Zur NA, Koch HM, Schuppe HC, Fieber C, et coll. Urinary di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)-Metabolites and male human markers of reproductive function. *Int J Hyg Environ Health* 2009, 212 : 648-653.
- Higuchi TT, Palmer JS, Gray LE Jr, Veeramachaneni DN (2003) Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent, or postpubertal exposure. *Toxicol Sci* 72:301-13.
- Hou, M. L., Chang, L. W., Chiang, C. J., Tsuang, Y. H., Lin, C. H., and Tsai, T. H. (2013). Pharmacokinetics of di-isononyl phthalate in freely moving rats by UPLC-MS/MS. *Int. J. Pharm.* 450(1-2), 36-43.
- Howdeshell KL, Rider CV, Wilson VS, Gray LE Jr (2008) Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environ Res.* 108:168-76.
- Hu GX, Lian QQ, Ge RS, Hardy DO, Li XK (2009) Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. *Trends Endocrinol Metab* 20:139-45.
- Huang PC, Kuo PL, Chou YY, Lin SJ, Lee CC. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environ Int* 2009, 35 : 14-20.
- Itoh H, Iwasaki M, Hanaoka T, Sasaki H, Tanaka T, et coll. Urinary phthalate monoesters and endometriosis in infertile Japanese women. *Sci Total Environ* 2009, 408 : 37-42.
- Johnson KJ, Heger NE, Boekelheide K (2012) Of mice and men (and rats): phthalate-induced fetal testis endocrine disruption is species-dependent. *Toxicol Sci* 129:235-48.

- Jonsson BA, Richthoff J, Rylander L, Giwercman A, Hagmar L. Urinary phthalate metabolites and biomarkers of reproductive function in young men. *Epidemiology* 2005, 16 : 487-493.
- Jost A, Vigier B, Prépin J, Perchellet JP (1973) Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm Res* 29:1-41.
- Jung, H., et al., The association between some endocrine disruptors in human plasma and the occurrence of congenital hypothyroidism. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013. 35(2): p. 278-83.
- Kay, V.R., C. Chambers, and W.G. Foster, Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in females. *Crit Rev Toxicol*, 2013. 43(3): p. 200-19.
- Keys, D. A., Wallace, D. G., Kepler, T. B., and Conolly, R. B. (1999). Quantitative evaluation of alternative mechanisms of blood and testes disposition of di(2-ethylhexyl) phthalate and mono(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicol Sci.* 49(2), 172-185.
- Keys, D. A., Wallace, D. G., Kepler, T. B., and Conolly, R. B. (2000). Quantitative evaluation of alternative mechanisms of blood disposition of di(n-butyl) phthalate and mono(n-butyl) phthalate in rats. *Toxicol Sci.* 53(2), 173-184.
- Kleymenova E, Swanson C, Boekelheide K, Gaido KW (2005) Exposure in utero to di(n-butyl) phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat Sertoli cells and disrupts Sertoli cell-gonocyte contact. *Biol Reprod* 73:482-90.
- Lambrot R, Livera G, Coffigny H, Pairault C, Frydman R, Habert R, Rouiller-Fabre V (2006) A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. *Biochimie* 88:1831-5.
- Latini G, Presta G, Delva, Parisi, et coll. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect* 2003, 111 : 1783-1785.
- Lecerf L, Rouiller-Fabre V, Levacher C, Gautier C, Saez JM, Habert R (1993) Stimulatory effect of follicle-stimulating hormone on basal and luteinizing hormone-stimulated testosterone secretion by fetal rat testis in vitro. *Endocrinology* 133:2313-8.
- Lee KY, Shibutani M, Takagi H, Kato N, Takigami S, Uneyama C, Hirose M (2004) Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology* 203 :221-38.
- Lehmann KP, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW (2004) Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci.* 81:60-8.
- Lehraiki A, Racine C, Krust A, Habert R, Levacher C (2009) Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci* 111:372-82.
- Li H, Kim KH (2003) Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on fetal and neonatal rat testis organ cultures. *Biol Reprod* 69:1964-72.
- Livera G, Delbès G, Pairault C, Rouiller-Fabre V, Habert R (2006) Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell Tissue Res* 324:507-21.
- Lomenick JP, Calafat AM, Castro MS, Mier R, Stenger P, et coll. Phthalate exposure and precocious puberty in females. *J Pediatr* 2010, 156 : 221-225.
- Lorber, M., and Calafat, A. M. (2012). Dose reconstruction of di(2-ethylhexyl) phthalate using a simple pharmacokinetic model. *Environ Health Perspect.* 120(12), 1705-1710.
- Lorber, M., and Koch, H. M. (2013). Development and application of simple pharmacokinetic models to study human exposure to di-n-butyl phthalate (DnBP) and diisobutyl phthalate (DiBP). *Environ Int.* 59, 469-477.
- Manikkam M et al., 2013. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations, PMID 23359474.
- Macleod DJ, Sharpe RM, Welsh M, Fiskens M, Scott HM, Hutchison GR, Drake AJ, van den Driesche S (2010) Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *Int J Androl.* 33:279-87. \*

- Mahood IK, Hallmark N, McKinnell C, Walker M, Fisher JS, Sharpe RM (2005) Abnormal Leydig Cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. *Endocrinology* 146:613-23.
- Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, Boisen KA, Damgaard IN, et coll. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect* 2006, 114 : 270-276.
- Mahood IK, Scott HM, Brown R, Hallmark N, Walker M, Sharpe RM (2007) In utero exposure to di(n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity. *Environ Health Perspect* 115(Suppl 1):55–61.
- Main KM, Skakkekaek NE, Virtanen HE, Toppari J (2010) Genital anomalies in boys and the environment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24:279-89.
- Martinez-Arguelles DB, Campioli E, Culty M, Zirkin BR, Papadopoulos V (2013) Fetal origin of endocrine dysfunction in the adult: The phthalate model. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 137:5-17.
- McKinnell C, Mitchell RT, Walker M, Morris K, Kelnar CJ, Wallace WH, Sharpe RM (2009) Effect of fetal or neonatal exposure to monobutyl phthalate (MBP) on testicular development and function in the marmoset. 24:2244-54.
- McKinnell C, Sharpe RM, Mahood K, Hallmark N, Scott H, Ivell R, Staub C, Jegou B, Haag F, Koch-Nolte F, Hartung S (2005) Expression of insulin-like factor 3 protein in the rat testis during fetal and postnatal development and in relation to cryptorchidism induced by in utero exposure to di (n-butyl) phthalate. *Endocrinology* 146:4536-44.
- Meeker, J.D. and K.K. Ferguson, Relationship between urinary phthalate and bisphenol A concentrations and serum thyroid measures in U.S. adults and adolescents from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2008. *Environ Health Perspect*, 2011. 119(10): p. 1396-402.
- Migliarini B et al., 2011. Perspectives on endocrine disruptor effects on metabolic sensors, PMID 21130769.
- Mitchell RT, Childs AJ, Anderson RA, van den Driesche S, Saunders PT, McKinnell C, Wallace WH, Kelnar CJ, Sharpe RM (2012) Do phthalates affect steroidogenesis by the human fetal testis? Exposure of human fetal testis xenografts to di-n-butyl phthalate. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E341-8.
- Mitchell RT, Saunders PT, Childs AJ, Cassidy-Kojima C, Anderson RA, Wallace WH, Kelnar CJ, Sharpe RM 2010 Xenografting of human fetal testis tissue: a new approach to study fetal testis development and germ cell differentiation. *Hum Reprod* 25:2405–14.
- Muczynski V, Cravedi JP, Lehraiki A, Levacher C, Moison D, Lecureuil C, Messiaen S, Perdu E, Frydman R, Habert R, Rouiller-Fabre V (2012a) Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on human and mouse fetal testis: In vitro and in vivo approaches. *Toxicol Appl Pharmacol* 261:97-104.
- Muczynski V, Lecureuil C, Messiaen S, Guerin MJ, N'tumba-Byn T, Moison D, Hodroj W, Benjelloun H, Baijer J, Livera G, Frydman R, Benachi A, Habert R, Rouiller-Fabre V (2012b) Cellular and molecular effect of MEHP Involving LXR $\alpha$  in human fetal testis and ovary. *PLoS One* 7:e48266.
- Mylchreest E, Sar M, Wallace DG, Foster PM (2002) Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 16:19–28.
- Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC, Foster PM (2000) Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol Sci* 55:143–51.
- Naville D et al. Low-dose food contaminants trigger sex-specific hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice, 2013 PMID 23756648.
- N'Tumba-Byn T, Moison D, Lacroix M, Lecureuil C, Lesage L, Prud'homme SM, Pozzi-Gaudin S, Frydman R, Benachi A, Livera G, Rouiller-Fabre V, Habert R (2012) Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PLoS One.* 7:e51579.
- Ormond G, Nieuwenhuijsen MJ, Nelson P, Toledano MB, Iszatt N, Geneletti S, Elliott P (2009) Endocrine disruptors in the workplace, hair spray, folate supplementation, and risk of hypospadias: case-control study. *Environ Health Perspect* 2009;117:303–307.

- O'Shaughnessy PJ, Fowler PA (2011) Endocrinology of the mammalian fetal testis. *Reproduction* 141:37-46.
- Pan G, Hanaokat T, Yoshimura M, Zhang S, Wang P, et coll. Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) : a cross-sectional study in China. *Environ Health Perspect* 2006, 114 : 1643-1648.
- Parks LG, Ostby JS, Lambricht CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, Gray LE Jr (2000) The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci* 58:339-49.
- Pereira-Fernandes A et al., 2013. Evaluation of a screening system for obesogenic compounds...., PMID 24155963.
- Ray, B., et al., Ovarian development in Wistar rat treated prenatally with single dose diisobutyl phthalate. *Bratisl Lek Listy*, 2012. 113(10): p. 577-82.
- Reddy BS, Rozati R, Reddy BV, Raman NV. Association of phthalate esters with endometriosis in Indian women. *BJOG* 2006, 113 : 515-520.
- Reproductive toxicology. Di-n-pentylphthalate. *Environ Health Perspect*, 1997. 105 Suppl 1: p. 255-6.
- Reproductive toxicology. Di-n-hexylphthalate. *Environ Health Perspect*, 1997. 105 Suppl 1: p. 251-2.
- Reproductive toxicology. Di-n-propylphthalate. *Environ Health Perspect*, 1997. 105 Suppl 1: p. 257-8.
- Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, Mujtabar R. Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil Steril* 2002, 78 : 1187-1194.
- Saillenfait, A.M., et al., Prenatal developmental toxicity studies on diundecyl and ditridecyl phthalates in Sprague-Dawley rats. *Reprod Toxicol*, 2013. 37: p. 49-55.
- Saillenfait, A.M., et al., Developmental toxic potential of di-n-propyl phthalate administered orally to rats. *J Appl Toxicol*, 2011. 31(1): p. 36-44.
- Saffarini CM, Heger NE, Yamasaki H, Liu T, Hall SJ, Boekelheide K (2012) Induction and persistence of abnormal testicular germ cells following gestational exposure to di-(n-butyl) phthalate in p53-null mice. *J Androl*. 33:505-13.
- Scott HM, Mason JI, Sharpe RM (2009) Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds *Endocr Rev* 30:883-925.
- Sharpe RM & Drake AJ. *Obesity* 2013.
- Sharpe RM, Irvine DS (2004) How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *B.M.J.*, 328(7437), 447-51.
- Sharpe RM, Skakkebaek NE (2008) Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril*. 89(2 Suppl):e33-8.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM (2001) Testicular dysgenesis syndrome : an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reprod* 16:972-8.
- Song XF, Wei GH, Liu X, Zhang DY, Chen X, Deng YJ (2008) Effects of diethylhexyl phthalate (DEHP) on INSL3 mRNA expression by Leydig cells derived from mouse embryonic bryos and in newborn mice. *J Int Med Res* 36:512-21.
- Spade DJ, Hall SJ, Saffarini C, Huse SM, McDonnell-Clark EV, Boekelheide K (2013) Differential response to abiraterone acetate and di-n-butyl phthalate in an androgen-sensitive human fetal testis xenograft bioassay *Toxicol Sci* Nov 27. [Epub ahead of print].
- Struve MF, Gaido KW, Hensley JB, Lehmann KP, Ross SM, Sochaski MA, Willson GA, Dorman DC (2009). Reproductive toxicity and pharmacokinetics of di-n-butyl phthalate (DBP) following dietary exposure of pregnant rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 86 :345-54.
- Suzuki Y, Yoshinaga J, Mizumoto Y, Serizawa S, Shiraishi H (2012) Foetal exposure to phthalate esters and anogenital distance in male newborns. *Int J Androl* 35:236-44.
- Svechnikov K, Izzo G, Landreh L, Weisser J, Söder O (2010) Endocrine disruptors and Leydig cell function (2010) *J Biomed Biotechnol* 2010. doi:p11: 684504. Epub 2010.

- Swan SH (2008) Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res* 108:177-84.
- Taxvig C et al., 2012. Differential effects of environmental chemicals and food contaminants on adipogenesis, biomarker release and pparg activation, PMID 22526026
- Thompson CJ, Ross SM, Gaido KW (2004) Di(n-butyl) phthalate impairs cholesterol transport and steroidogenesis in the fetal rat testis through a rapid and reversible mechanism. *Endocrinology* 145 :1227-37.
- Toppari J, Virtanen H, Skakkebaek NE, Main KM (2006) Environmental effects on hormonal regulation of testicular descent. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:184-6.
- Toppari J, Virtanen HE, Main KM, Skakkebaek NE (2010) Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88:910-9.
- Trassande L et al 2013. Phthalates and the diets of US children and adolescents » PMID240411780.
- Trasande L et al 2013. Race/ethnicity-specific associations of urinary phthalates with childhood body mass in a nationally representative sample' PMID 23428635.
- Van den Driesche S, Walker M, McKinnell C, Scott HM, Eddie SL, Mitchell RT, Seckl JR, Drake AJ, Smith LB, Anderson RA, Sharpe RM (2012) Proposed role for COUP-TFII in regulating fetal Leydig cell steroidogenesis, perturbation of which leads to masculinization disorders in rodents. *PLoS One*. 2012;7(5):e37064.
- Veeramachaneni DN, Klinefelter GR (2013). Phthalate-Induced Pathology in the Foetal Testis Involves More Than Decreased Testosterone Production. *Reproduction*. 2013 Nov 26. [Epub ahead of print].
- Ventrice, P., Ventrice, D., Russo, E., and De, S. G. (2013) Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol* 36(1), 88-96.
- Wang H et al 2013. Urinary phthalate metabolites are associated with BMI and WC in Chinese school children » PMID23437242.
- Welsh M, Saunders PT, Fiskens M, Scott HM, Hutchison GR, Smith LB, Sharpe RM (2008) Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest* 118:1479–90.
- Wilson VS, Lambricht C, Furr J, Ostby J, Wood C, Held G, Gray LE Jr (2004) Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced *insl3* gene expression in the fetal rat testis. *Toxicol Lett* 146:207-15.
- Wine RN, Li LH, Barnes LH, Gulati DK, Chapin RE (1997) Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspect* 105:102-7.
- Wirth JJ, Rossano MG, Potter R, Puschecke E, Daly DC, et coll. A pilot study associating urinary concentrations of phthalate metabolites and semen quality. *Syst Biol Reprod Med* 2008, 54 : 143-154.
- Wittassek, M., Angerer, J., Kolossa-Gehring, M., Schafer, S. D., Klockenbusch, W., Dobler, L., Günsel, A. K., Müller, A., and Wiesmüller, G. A. (2009). Fetal exposure to phthalates--a pilot study. *Int. J. Hyg. Environ Health* 212(5), 492-498.
- Wolff MS, Engel SM, Berkowitz GS, Ye X, Silva MJ, et coll. Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ Health Perspect* 2008, 116 : 1092-1097.
- Wolff MS, Teitelbaum SL, Pinney SM, Wlindham G, Liao L, et coll. Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoeogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. *Environ Health Perspect* 2010, 118 : 1039-1046.
- Wu, M.T., et al., Intake of phthalate-tainted foods alters thyroid functions in Taiwanese children. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e55005.
- Zhang YH, Zheng LX, Chen BH. Phthalate exposure and human semen quality in Shanghai : a cross-sectional study. *Biomed Environ Sci* 2006, 19 : 205-209

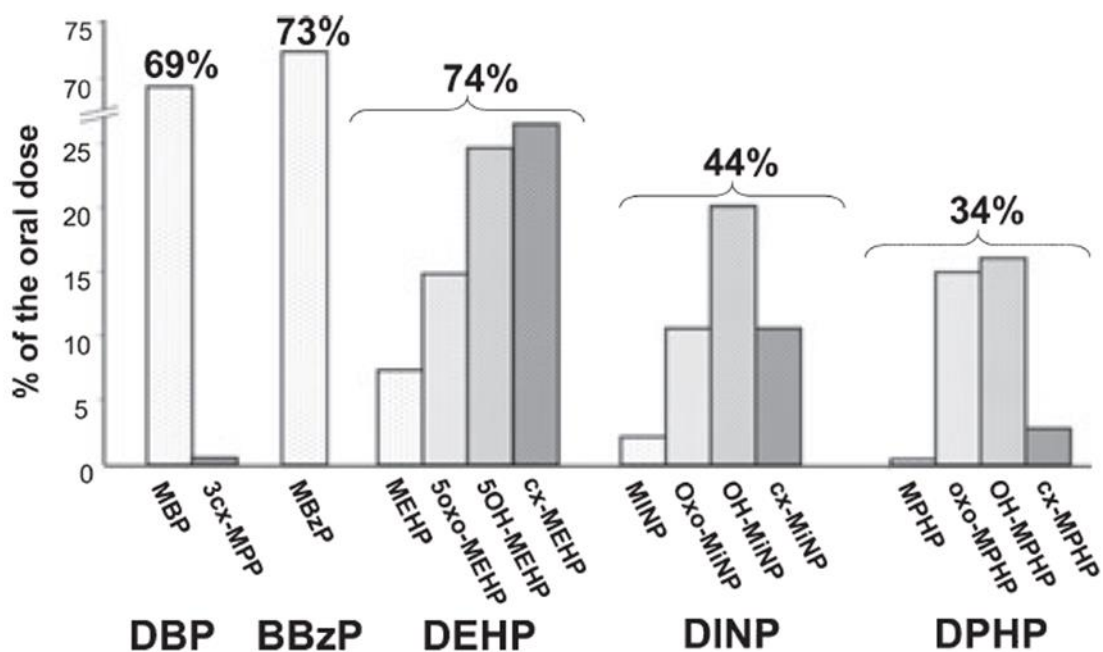
Zhang Y, Lin L, Cao Y, Chen B, Zheng L, et coll. Phthalate Levels and Low Birth Weight : A Nested Case-Control Study of Chinese Newborns. J Pediatr 2009, 155 : 500-504.

---

## **ANNEXES**

---

### Annexe 1 : Elimination urinaire des métabolites de phtalates en lien avec la dose administrée par voie orale chez l'Homme.



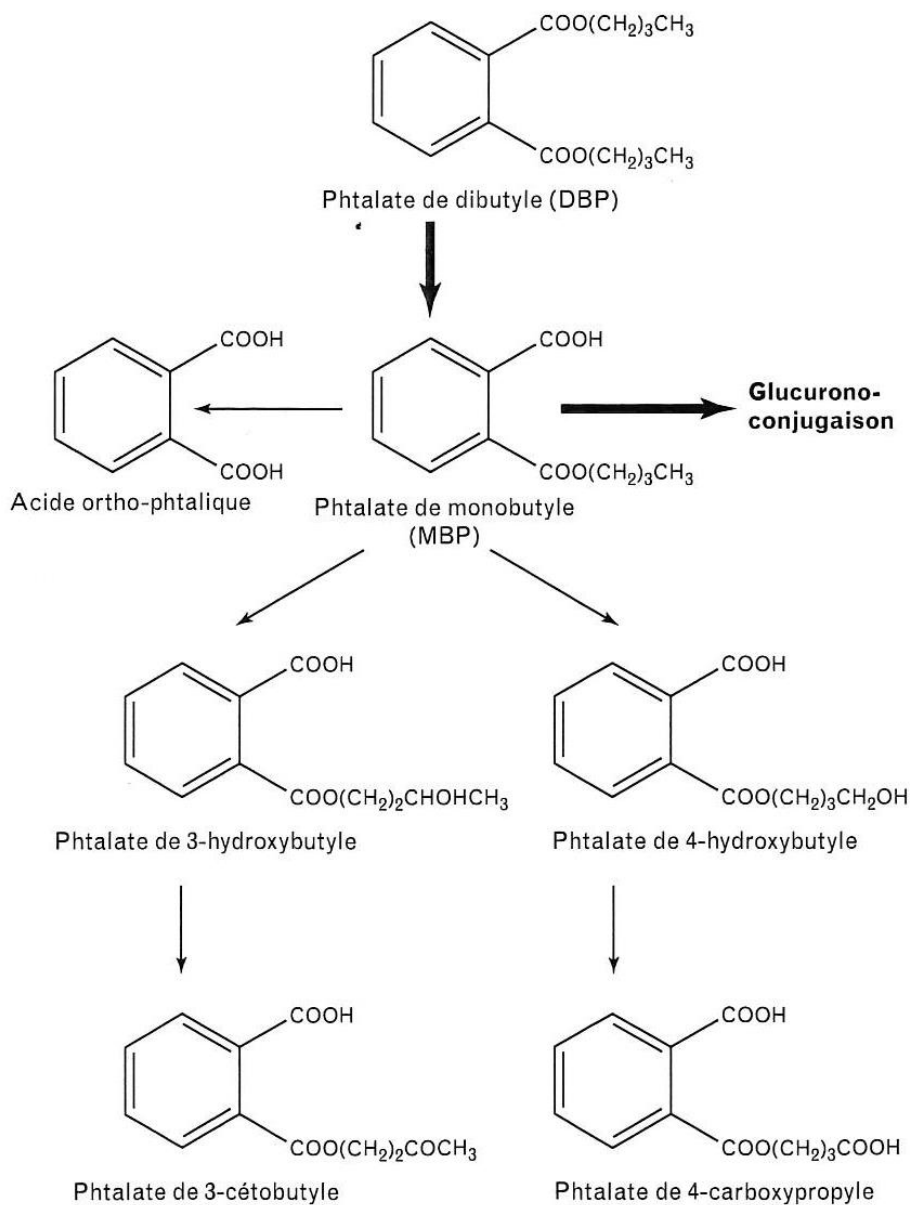
Elimination urinaire des métabolites de phtalates en lien avec la dose administrée par voie orale

Selon Wittassek & Angerer, 2007



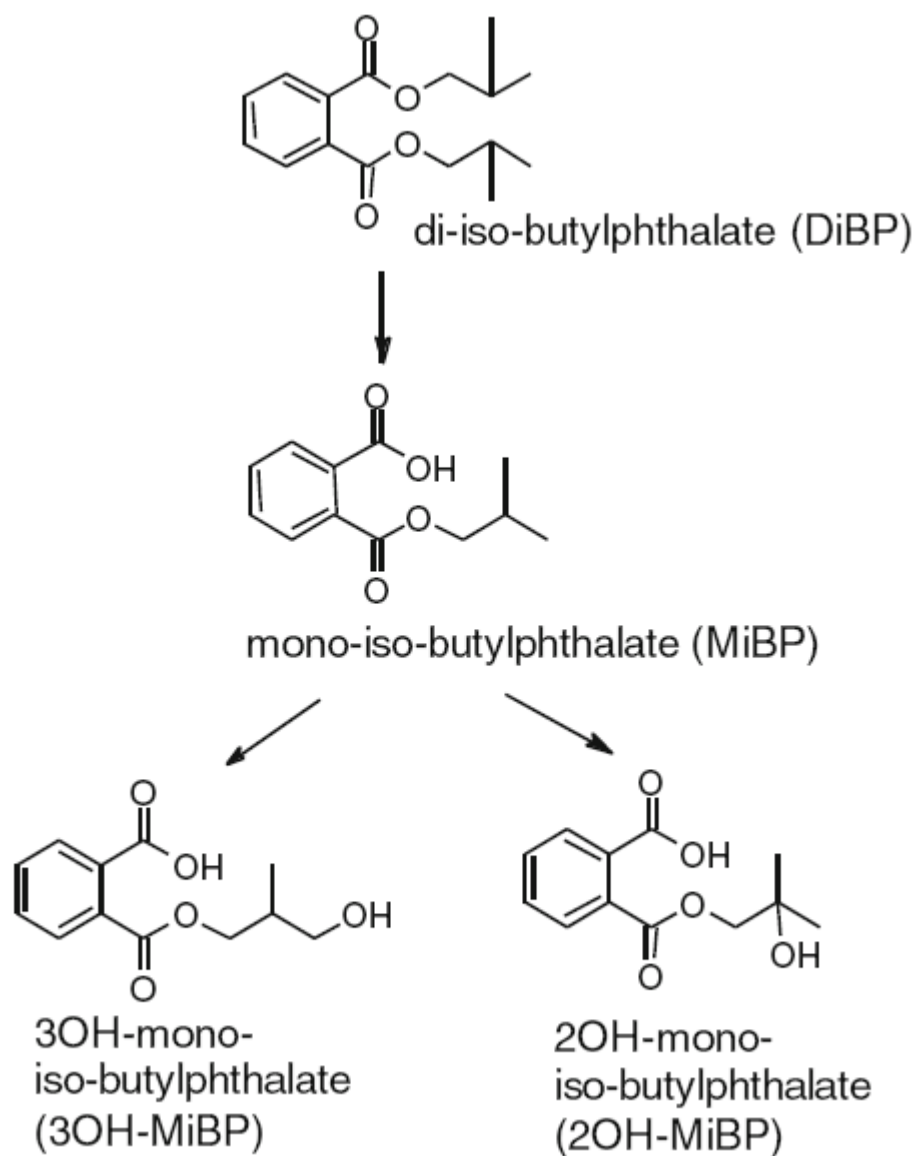
## Annexe 2 : Schéma métabolique du DBP (phtalate de dibutyle ou di-n-butyl-phtalate)

cf. : Schéma métabolique du DBP (phtalate de dibutyle ou di-*n*-butyl-phtalate)



**Annexe 3 : Schéma métabolique du DiBP (di-iso-butyl-phthalate)**

Schéma métabolique du DiBP (di-iso-butyl-phthalate)

Selon Koch et al. *J Chrom* 2012

### Annexe 4 : Schéma métabolique du DINP (di-iso-nonyl-phthalate)

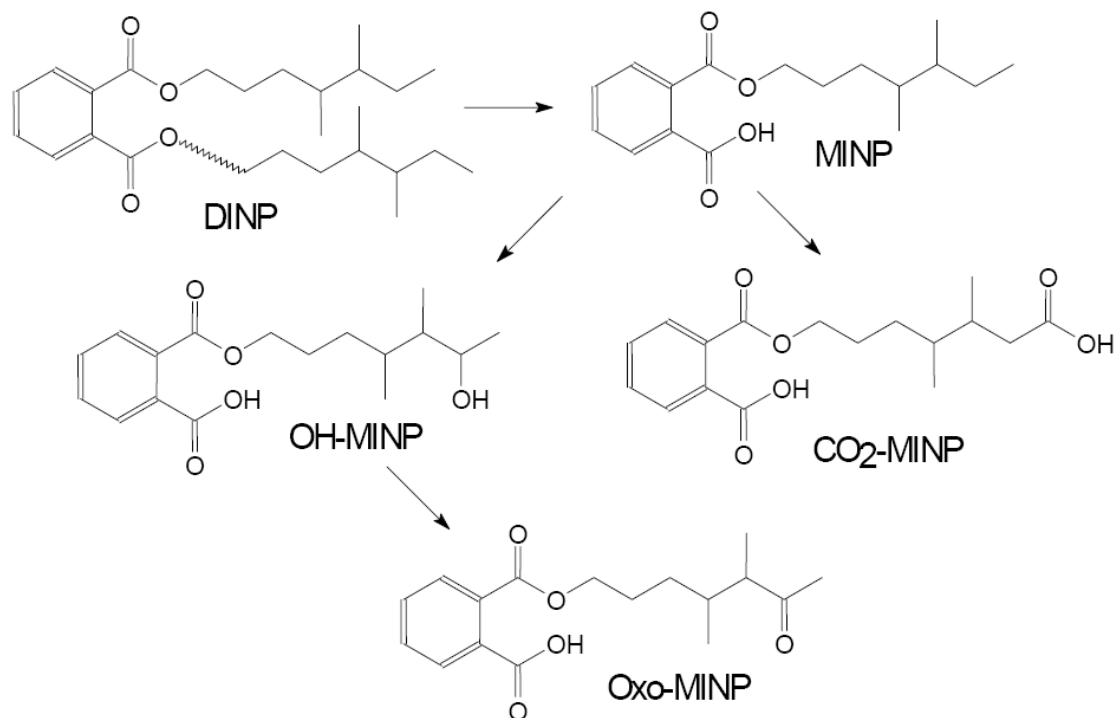


Schéma métabolique du DINP (di-iso-nonyl-phthalate)

	DINP-1	DINP-2	DINP-3
Methylethyl hexanols	5 - 10	5 - 10	65 - 70
Dimethyl heptanols	45 - 55	40 - 45	20 - 25
Methyl octanols	5 - 20	35 - 40	--
n-Nonanol	0 - 1	0 - 10	--
Isodecanol	15 - 25	--	--

### Annexe 5 : Schéma métabolique du DIDP (diisodecyl phthalate)

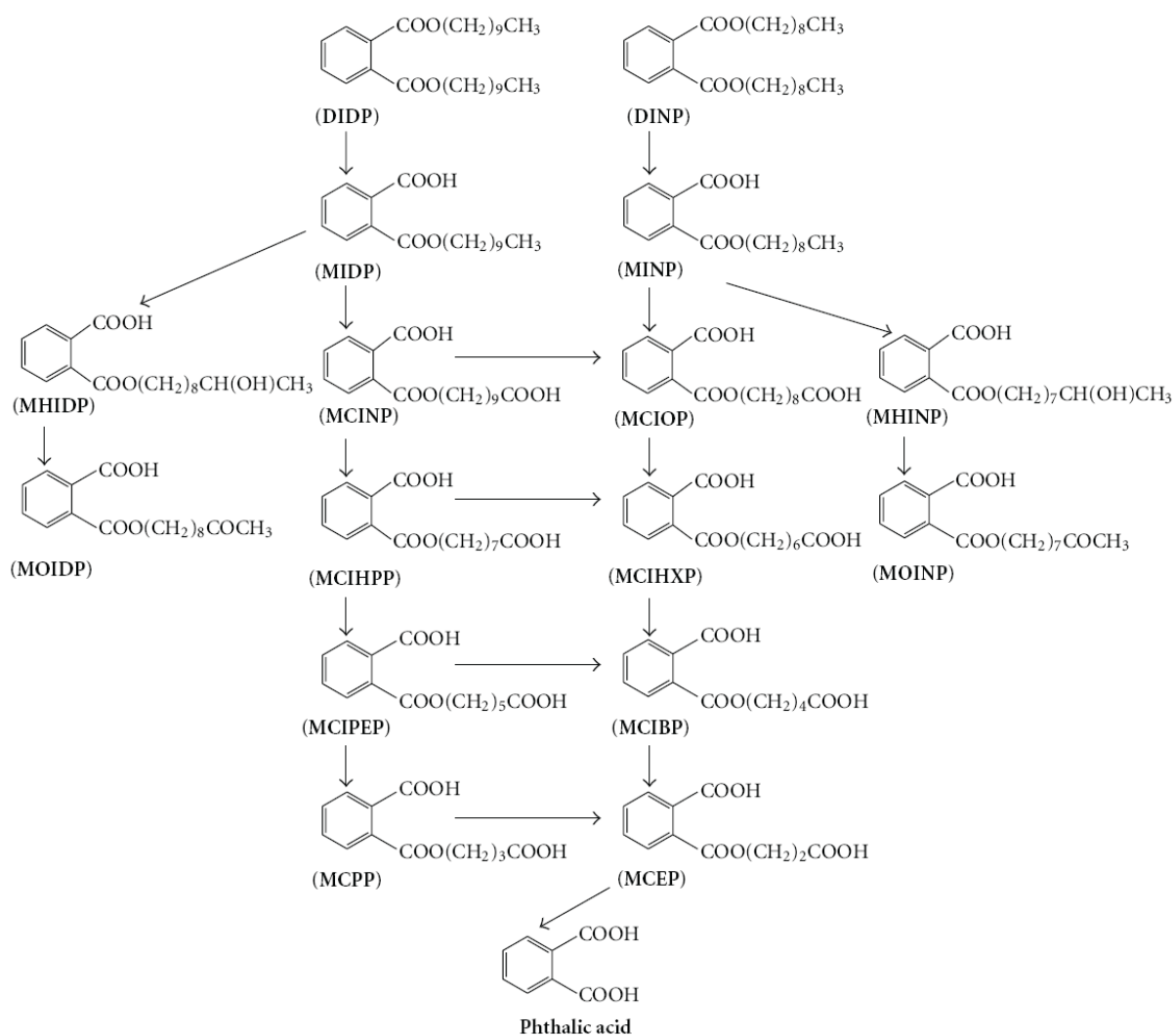


Schéma métabolique du DIDP (diisodecyl phthalate)

Selon Saravanabhavan & Murray 2012

### Annexe 6 : Schéma métabolique du DnPP (di-n-pentyl-phthalate)

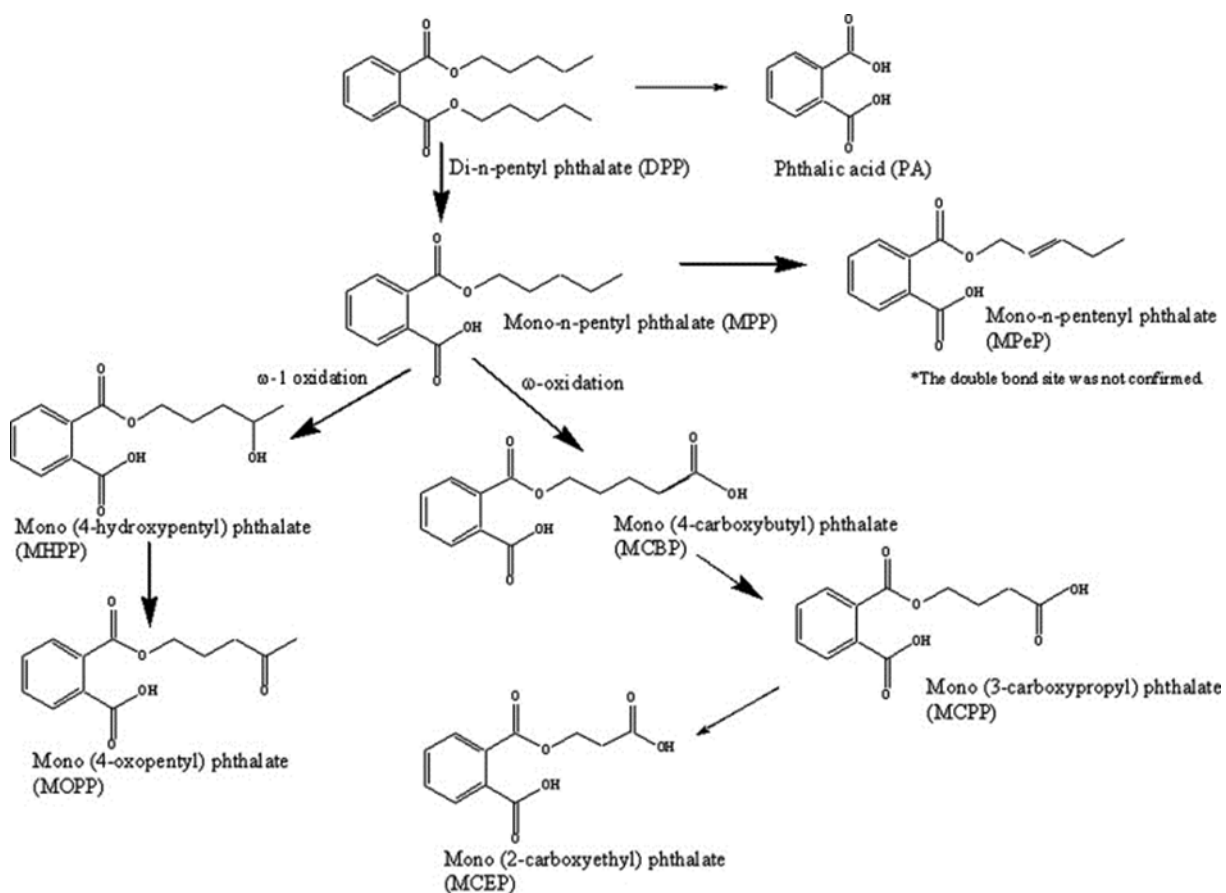


Schéma métabolique du DnPP (di-n-pentyl-phthalate)  
Selon Silva et al. Chemosphere 2011

Annexe 7 : Schéma métabolique du DPHP (di-2propyl-heptyl-phtalate)

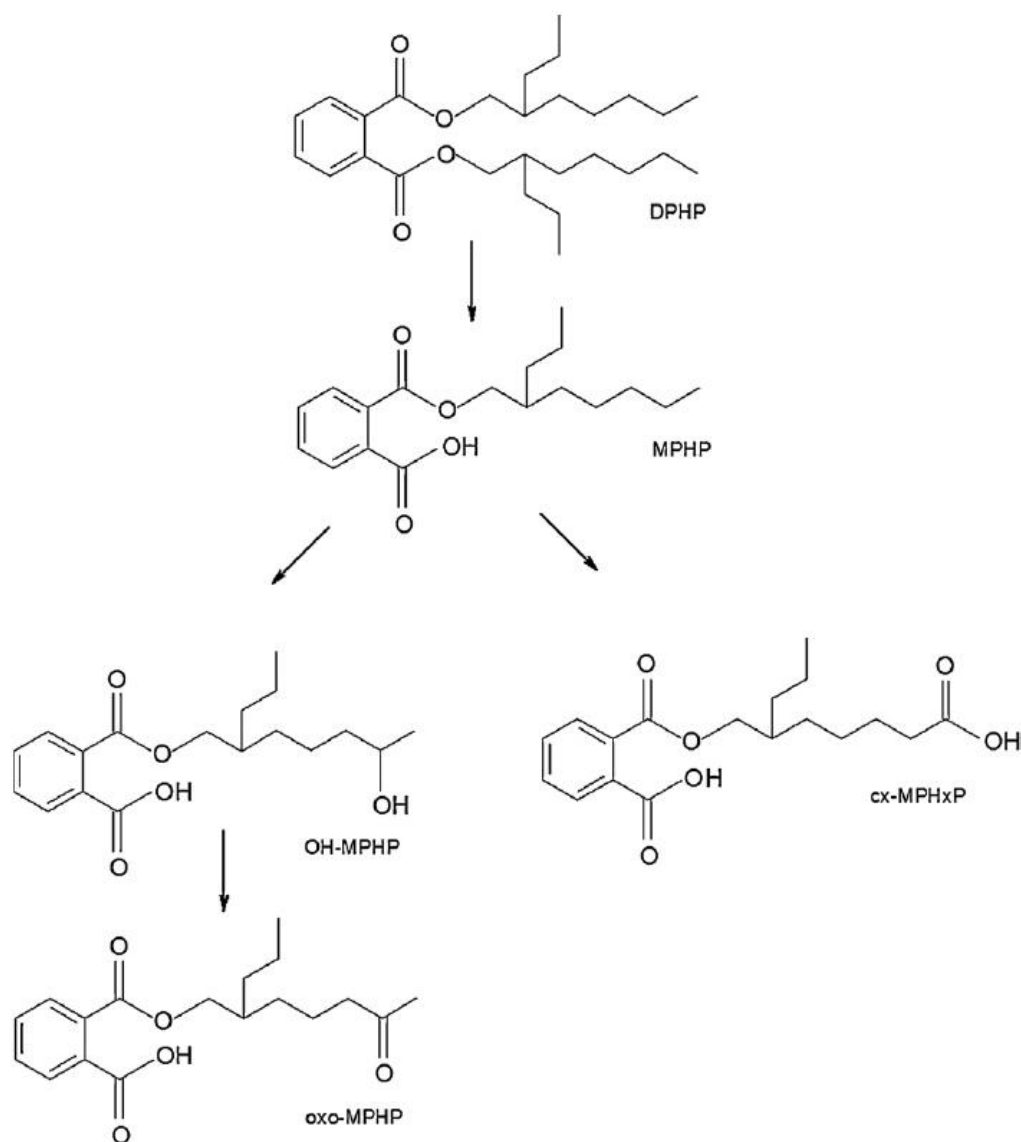


Schéma métabolique du DPHP di-2propyl-heptyl-phtalate)

Selon Gries et al. J Chrom 2012

## Annexe 8 : Résultats de l'expertise Inserm ou d'expertises ANSES sur les phtalates tels que le DEHP, DBP, BBP

Face aux interrogations sur la question de la fertilité et des perturbateurs endocriniens, l'Inserm a été saisi en 2008 en vue d'analyser les données disponibles sur les effets sur la reproduction de certaines substances, largement représentées dans les produits de grande consommation, dont les phtalates. Pour ce faire, l'Inserm a constitué un groupe d'experts qui ont réalisé un état des lieux des connaissances disponibles en date du second semestre 2010. Un rapport d'expertise collective intitulé « reproduction en environnement » a été publié en 2011 à l'issue de ces travaux (Inserm, 2011).

Les effets pris en compte dans cette expertise sont : les effets sur la fertilité (caractéristiques qualitatives et quantitatives des spermatozoïdes, aptitude biologique à obtenir une grossesse), toutes les anomalies des organes impliqués dans la fonction de reproduction (gonades, glandes mammaire, système endocrinien), le cancer du testicule et certains cancers dits hormonaux-dépendants. Les troubles du développement d'autres organes et diverses pathologies pouvant être induites par des expositions durant la vie intra-utérine, n'entraient pas dans le champ de l'expertise de l'Inserm.

### 1) Etudes épidémiologiques

Plusieurs études ont recherché les relations entre exposition aux phtalates et des anomalies de l'appareil reproducteur chez l'Homme adulte. Le protocole de ces études était différent (études observationnelles, études cas-témoins, études exposés-non exposés) ainsi que les indicateurs étudiés (paramètres spermatiques, puberté précoce endométriose, hormones...). Dans la plupart des études les auteurs ne s'intéressent pas à un phtalate en particulier mais à plusieurs phtalates et à leurs métabolites.

#### a) Genre masculin

- Effets sur les paramètres du sperme

Hauser et al. (2006) ont cherché les corrélations entre l'excrétion urinaire de métabolite du DEHP, du DBP, du BzP et la qualité des spermatozoïdes. 463 hommes ont été recrutés dans le Massachusetts lors d'une consultation pour analyse spermatique en raison d'une infertilité. L'étude utilise les critères de l'OMS pour évaluer la qualité des éjaculats : < 20 millions / ml ; moins de 50 % des spermatozoïdes mobiles, moins de 4% des spermatozoïdes morphologiquement normaux.

Le groupe de référence est constitué de ceux ayant des résultats au-dessus des valeurs citées. Un seul échantillon d'urine est prélevé pour l'analyse des métabolites. Les résultats montrent une relation dose réponse entre l'excrétion urinaire de métabolites du DBP et la diminution du nombre de spermatozoïdes au ml ou de leur mobilité. Les résultats pour les autres phtalates ne sont pas significatifs.

- Effets sur les hormones de la reproduction

Dans une étude de type exposés/non exposés réalisée en Chine, 74 hommes exposés au sein d'une usine de polychlorure de vinyle au DBP et au DEHP sont comparés à 63 hommes non

exposés appariés sur l'âge et la consommation tabagique (Pan et al. 2006), Les concentrations urinaires des métabolites MBP (DBP) et MEHP (DEHP) et les concentrations plasmatiques de FSH, LH, testostérone et E2 sont déterminées. Le MBP et le MEHP sont détectés chez tous les hommes à l'exception d'un homme non exposé. Les travailleurs exposés ont des taux de MBP et MEHP significativement plus élevés que les non exposés, traduisant ainsi la réalité de l'exposition (respectivement 644,3 versus 129,6 µg/g de créatinine pour MBP et 565,7 versus 5,7 µg/g de créatinine pour le MEHP). Une corrélation négative entre la concentration en testostérone libre sérique et la concentration urinaire de MBP ( $r = -0,24$  ;  $p = 0,006$ ) et MEHP ( $r = -0,24$  ;  $p = 0,005$ ) est mise en évidence. Les exposés ont un taux de testostérone significativement plus bas que les non exposés ( $8,4 \pm 1,5$  versus  $9,7 \pm 1,4$  µg/l,  $p = 0,019$ ). Un biais dans le mode de prélèvement (1 seul prélèvement sanguin et urinaire) est évoqué par les auteurs, en raison des fortes fluctuations des taux hormonaux et des temps de demi-vies des phtalates relativement rapide. Néanmoins, la corrélation négative avec la testostérone est en accord avec celle retrouvée dans l'étude de Duty (Duty et al., 2005). A l'inverse, l'étude de Jönsson rapportée au-dessus n'a pas mis en évidence de corrélation entre les phtalates urinaires et la testostérone (Inserm, 2011).

Dans une étude expérimentale humaine, 26 jeunes hommes volontaires se sont appliqués quotidiennement et pendant deux semaines une crème standard sur l'ensemble du corps à raison de 2 mg/cm<sup>2</sup> (Janjua, 2007). La première semaine la crème n'est pas modifiée, alors que la deuxième semaine on ajoute 2 % en masse de di éthyle phtalate (DEP), 2 % de di butyle phtalate (DBP) et 2 % de butyle parabene (BP). Les métabolites sériques de ces substances sont dosés à intervalles de temps réguliers ainsi que le taux de certaines hormones : hormone stimulant les follicules (FSH), hormone lutéinisante (LH), testostérone, estradiole, inhibine B, hormone stimulant la thyroïde (TSH), thyroxine libre (FT4), triiodothyroxine totale (T3) et thyroxine totale (T4). Les résultats montrent qu'il y a bien un passage percutané des phtalates et du parabene testés. Cependant, les taux sériques des hormones recherchées ne sont pas modifiés (Janjua, 2007).

**En conclusion, chez l'homme adulte, la majorité des études retrouvent un lien entre les concentrations de phtalates urinaires (ou de leur métabolites) et une altération des paramètres du sperme, dont la concentration et la morphologie des spermatozoïdes ainsi qu'une augmentation de la fragmentation de l'ADN du gamète mâle. Cependant, quelques études ne mettent pas en évidence d'effets des phtalates sur les paramètres du sperme. Par ailleurs, une étude de type exposé/non exposé met en évidence une relation entre des concentrations élevées de MBP et des concentrations basses de testostérone (Pan et al., 2006).**

#### b) Genre féminin

Peu d'études ont cherché à évaluer les conséquences d'une exposition *in utero* aux phtalates sur le développement de l'appareil génital des nouveau-nés de sexe féminin. D'autres études s'intéressant à la fertilité et l'appareil reproducteur de la femme ont évalué les risques de puberté précoce ou d'endométriose en relation avec les concentrations plasmatiques ou urinaires de phtalates ou de leurs métabolites

- Endométriose

Trois études évaluant l'impact possible d'une exposition des femmes aux phtalates sur le risque d'endométriose ont été répertoriées (Cobellis et al. 2003, Reddy et al. 2006, Itoh et al. 2009).



Cobellis et al. (2003) ont étudié 55 femmes atteintes d'endométriose et 24 femmes contrôles sains. Cette a montré que les femmes atteintes d'endométrioses ont des concentrations plasmatiques en DEHP significativement plus élevée par rapport au contrôle (med : 0.57 µg/mL vs 0.18 µg/mL), 92.6% de ces femmes atteintes d'endométriose avaient également des concentrations détectables en DEGHP et/ou MEHP dans le fluide péritonéale. Les auteurs soulignent que c'est la première étude qui montre une association entre la concentration plasmatique en DEHP et l'endométriose, ceci suggérant un lien possible entre les phtalates et certaines pathologies.

Reddy et al. (2006) ont étudié 49 femmes infertiles atteintes d'endométriose pelvienne diagnostiquée par cœlioscopie à l'hôpital, ainsi que 38 femmes infertiles et 21 femmes fertiles ayant subi une cœlioscopie pour d'autres problèmes gynécologiques. Cette étude a montré des niveaux sanguins moyens de DEHP, DNOP, BBzP et DBP plus élevés dans le groupe des femmes atteintes d'endométriose (respectivement 2,44, 3,32, 0,66 et 0,44 g/l) que dans les deux groupes de femmes sans endométriose. Une tendance à l'augmentation des niveaux sanguins pour ces composés était suggérée avec le degré de sévérité d'endométriose.

Les études suggérant un lien positif entre l'exposition à plusieurs phtalates et le risque d'endométriose possèdent cependant quelques limites importantes. Elles s'appuient sur des dosages sanguins de phtalates qui ont une demi-vie très courte (< 1heure pour le DEHP). La mesure de l'exposition rétrospective, au moment de l'examen clinique, est ainsi problématique. De plus, les phtalates dosés peuvent être issus du matériel utilisé pour les prélèvements sanguins. Aucune autre information permettant d'exclure une contamination, différentielle ou non, des prélèvements sanguins n'est apportée par ces études. De plus, les résultats de ces études sont descriptifs et ne tiennent pas compte de facteurs de confusion possibles, excepté l'âge des femmes .

Une seconde étude (Itoh et al. 2009) a proposé d'évaluer l'association entre les dosages urinaires de phtalates et le degré de sévérité d'endométriose parmi 137 femmes japonaises en âge de procréer ayant consulté pour infertilité et ayant subi un examen cœlioscopique. Les participantes étaient interviewées avec un questionnaire standardisé permettant de prendre en compte différents facteurs de confusion. Les premières urines du matin étaient recueillies avant la cœlioscopie. L'étude a montré que les 6 métabolites analysés dans les urines (MEP, MBP, MEHP, MEHHP, MEOHP, MBzP) étaient retrouvés dans tous les échantillons ou presque. Cette étude, contrairement à la précédente n'a pas mis en évidence d'association entre endométriose et concentrations urinaires en phtalates.

- Fonction thyroïdienne

Récemment des chercheurs ont étudié l'exposition de femmes enceintes aux phtalates et certains indicateurs de la fonction thyroïdienne (Huang, 2007). Des échantillons de sérum et d'urine ont été prélevés chez 76 femmes enceintes taiwanaises au cours du deuxième trimestre de grossesse. Les dosages hormonaux sériques incluaient : l'hormone stimulant la thyroïde (TSH), triiodothyronine (T3), thyroxine (T4) et thyroxine libre (FT4). Les dosages urinaires portaient sur trois monoesters phtaliques: mono butyle phtalate (MBP métabolite du DBP), mono éthyle phtalate (MEP) et mono ethylhexyl phtalate (MEHP). Les taux médians urinaires de MBP, MEP et MEHP étaient de 81,8, 27,7 et 20,6 ng/ml. Des corrélations légèrement négatives mais significatives ont été trouvées entre T4 et MBP urinaire (R =-0,248, P < 0,05) et entre FT4 et MBP urinaire (R =-0,368, P < 0,05). Après ajustement sur l'âge, l'index de masse corporel et la parité, les niveaux de MBP urinaires ont montré des associations négatives avec des FT4 et T4 (FT4 : R =-0,110, P < 0.001); T4 : R =-0,112, P = 0,003). Les auteurs concluent que l'exposition au di-n-butyl phtalate (DBP) peut affecter l'activité thyroïdienne chez les femmes enceintes, mais le mécanisme de cet effet n'est pas clairement élucidé. De nouvelles études sont nécessaires pour élucider le mécanisme d'action et examiner si les autres facteurs liés à l'exposition DBP changent la fonction de la thyroïde.

- Glande mammaire

La structure chimique des phtalates étant semblable aux œstrogènes « naturels », ils sont suspectés de perturber le système endocrinien par agonisme ou antagonisme avec les hormones stéroïdiennes. Dans une étude récente, un test d'ADN (EstrArray) est utilisé pour comparer les effets de 4 phtalates à 10 µM (butyle benzyle phtalate (BBP), dibutyle phtalate (DBP), diéthyle phtalate (DEP) et di-isopropyle phtalate (DIP)) et du 17-beta-estradiol (E2) à 10 nM sur l'expression de gènes sensibles aux œstrogènes par les cellules MCF-7. Les profils de chaque phtalate et de l'E2 sont comparés par analyse des corrélations (coefficient de corrélation "r"). On constate que le profil d'expression génique dû au BBP est le plus fortement corrélé avec le profil de l'E2 ( $r = 0,85$ ). Le DEP et le DIP affichent des corrélations modérées (respectivement :  $r = 0,52$  et  $r = 0,49$ ). Le dibutyle phtalate est le plus faiblement (mais toujours significativement) corrélé avec E2 ( $r = 0,36$ ). Entre phtalates, les paires DEP-DIP et DIP-DBP ont montré de hauts niveaux de corrélations (respectivement :  $r = 0,90$  et  $r = 0,80$ ) et les autres paires des corrélations plus modérées. L'analyse de six groupes fonctionnels de gènes (des enzymes, la signalisation, la prolifération, la transcription, le transport et d'autres) indique que les gènes codant pour les enzymes, la transcription et d'autres groupes fonctionnels ont montré des réponses communes aux phtalates et à l'E2. Ces résultats indiquent que la structure chimique des substances est fortement prédictive de leur activité oestrogénique et peut être évaluée par l'analyse de microtableaux concentrée en groupement approprié des gènes sensibles (Parveen, 2008). Les résultats de cette étude ne peuvent pas servir à définir un niveau sans effets oestrogéniques du DBP mais apportent un éclairage significatif sur l'existence de cette propriété pour le DBP et sur les mécanismes sous-jacents.

**En conclusion chez la femme, peu d'études ont évalué le rôle possible de l'exposition aux phtalates sur la santé reproductive des femmes. Seules quelques études évaluant le risque d'endométriose ont été spécifiquement évaluées et les preuves apportées de l'existence possible d'un lien entre phtalates et endométriose sont insuffisantes. Les effets de l'exposition aux phtalates sur la fonction ovulatoire et certains niveaux hormonaux (œstradiol, progestérone, LH, FSH) suggérés dans les études animales ne sont pas relatés chez la femme (Inserm, 2011). Un effet spécifique du DBP n'a pu être retrouvé.**

c) Effet sur le développement in utero

- Cryptorchidie, fonction leydigienne
- Effet sur la distance anogénitale

Le groupe de Swan (Swan et al., 2005, 2008) ont étudié les liens entre exposition prénatale aux phtalates et la distance anogénitale.

Une première étude épidémiologique a été publiée en 2005 par Swan et al. sur une cohorte de 346 femmes enceintes (Swan, 2005). Elle décrit une corrélation positive entre les concentrations des principaux métabolites du DBP (le MBP) ainsi que de trois autres métabolites des phtalates retrouvés dans l'urine des mères au cours de la grossesse et l'incidence d'apparition de malformations génitales décrites lors d'un examen postnatal (moyenne 12,6 mois après la naissance) des 85 enfants mâles retenus pour la poursuite de l'étude. Parmi ces 85 enfants pour lesquels un examen d'urine de la mère avait été réalisé, 25 présentaient une diminution de l'index anogénital (distance anogénitale/poids) de 18,3 % en moyenne. Parmi ces enfants, 20 % présentaient un trouble uni ou bilatéral de la migration testiculaire, et une proportion plus faible (non indiquée) présentait une diminution de la taille de la verge et une hypoplasie scrotale. La concentration moyenne des métabolites phtaliques associés à un index anogénital court et un trouble de la migration testiculaire est similaire à celles trouvée chez 25 % de la population féminine des USA (échantillon national) (Silva, 2004). Il en ressort que des niveaux d'exposition

habituels des femmes pourraient, lors d'une grossesse, être responsable d'atteinte subtile des organes reproducteurs mâle. Ceci indiquerait que les humains pourraient être plus sensibles que les rongeurs à une exposition prénatale aux phtalates. Sharpe souligne l'importance de cette première étude épidémiologique humaine menée par Swan et al., car elle relance l'importance du rôle que l'exposition aux phtalates pendant la grossesse pourrait jouer dans l'étiologie des désordres reproductifs chez l'homme (Sharpe, 2005).

En 2008, Swan et al. ont publié une nouvelle étude sur 106 nourrissons mâles examinés entre 2 et 36 mois lors de la première visite postnatale (moyenne : 12,8 mois). Les dosages de métabolites MEP, MBP, MEHP, MEHHP et MEOHP (correspondant respectivement aux phtalates parents suivants : DEP, DBP et DEHP pour les trois derniers) sont effectués dans les urines à 28,6 semaines d'aménorrhée en moyenne. Les concentrations des métabolites sont distribuées en quartiles et un score total prenant en compte tous les phtalates est calculé (score de 0 à 15). Les seins, testicules, pénis sont examinés chez le nouveau-né ainsi que la distance anogénitale. Les concentrations urinaires (MEP, MBP, MEHP, MEHHP, MEOHP) sont inversement corrélées avec la distance anogénitale. Les concentrations urinaires moyennes des métabolites du DEHP (MEHP, MEHHP, MEOHP) et de MEP sont supérieures dans le groupe avec une distance anogénitale plus courte.

En 2006, Marsee et al. ont estimé les expositions aux phtalates de 214 mères ayant accouché de garçon avec une distance anogénitale réduite, en dosant les métabolite urinaire de 5 phtalates connus pour leurs effets sur le développement des organes sexuels (di-n-butyle phtalate (DBP), diéthyle phtalate (DEP), butylbenzyle phtalate (BBP), diisobutyle phtalate (DiBP) et di-2-éthylhexyle phthalate (DEHP) [Marsee, 2006]. Les expositions médianes et 95<sup>ème</sup> percentile sont respectivement de : 0,99 et 2,68 µg/kg/j pour le DBP; 6,64 et 112,3 µg/kg/j pour le DEP; 0,50 et 2,47 µg/kg/j pour le BBP; 1,32 et 9,32 µg/kg/j pour le DEHP. Les auteurs estiment que ces expositions sont très inférieures aux seuils d'effets dérivés par l'US-EPA à partir des études chez l'animal : 100 µg/kg/j (DBP), 800 µg/kg/j (DEP), 200 µg/kg/j (BBP), et 20 µg/kg/j (DEHP). Toutefois, ces résultats ne sont pas comparés à un groupe « témoins » c'est-à-dire de nouveau-nés mâles ayant une distance anogénitale normale. De plus, les cofacteurs comme la consommation d'alcool et/ou de tabac ne sont pas pris en compte. Ces résultats doivent donc être interprétés avec précaution.

L'équipe de Huang (Huang et al., 2009) s'est également intéressée à l'exposition prénatale aux phtalates et aux résultats de l'examen du nouveau-né. Pour apprécier l'exposition prénatale, des dosages des métabolites MMP, MEP, MBP, MEHP, MBzP (correspondant aux phtalates parents suivants : DMP, DEP, DBP, DEHP, BBzP) sont effectués au moment de l'amniocentèse dans les urines et le fluide amniotique (16-20 semaines de gestation) chez 65 mères retenues pour l'étude car présentant une amniocentèse normale. Soixante-quatre nouveau-nés sont suivis (31 filles, 33 garçons). Les MBP et MEHP sont détectés respectivement dans 100 % (médiane 85,5 µg/l et 81,3 µg/l pour les filles et les garçons) et dans plus de 90 % (médiane 24 µg/l et 22,1 µg/l pour les filles et les garçons) des échantillons de liquide amniotique. Les autres métabolites sont à l'état de traces dans le fluide de l'amniocentèse. Dans les urines, le taux de détection est de 100 % pour le MBP, 98 % pour le MEHP, 96 % pour le MEP, 86 % MMP, 63 % pour le MBzP. Ainsi, cette étude confirme l'exposition de la mère et probablement du fœtus durant la grossesse.

L'examen des nouveau-nés met en évidence une distance anogénitale plus courte dans le groupe à haute concentration de MBP dans le fluide amniotique comparé au groupe à concentration plus basse (groupes dichotomisés en fonction de la médiane de MBP) chez les nouveau-nés filles (13,9 versus 17,6 mm, p=0,024). Le même profil est retrouvé pour le MEHP amniotique. L'index de distance anogénitale en fonction du poids ou de la taille est également plus court dans le groupe à haute concentration en MBP chez les filles. A l'inverse, chez les garçons cette différence n'est pas observée. Les auteurs suggèrent une plus grande sensibilité des fœtus féminins à un effet anti-androgène des phtalates pour expliquer la différence d'effet retrouvée en fonction du sexe. Il faut noter malgré les résultats intéressants l'effectif réduit de cette étude (31 filles, 33 garçons).

Si de nombreuses questions restent posées (par exemple comment expliquer les différences en fonction du sexe dans l'étude de Huang), les résultats de l'étude de Swan, qui présente l'effectif le plus important de garçons examinés, suggèrent de par le raccourcissement de la distance anogénitale, une action des phtalates sur l'androgénisation du fœtus. Selon le rapport de l'Inserm, d'autres études sur des effectifs plus larges sont nécessaires pour confirmer ces premiers résultats.

- Hypospadias

Aucune étude rapportant un lien entre hypospadias et exposition au DBP n'a été recensée.

- Autres effets sur différents paramètres du développement chez le nouveau né

Zhang et al. (2009), à Shanghai, se sont intéressés aux relations entre phtalates et poids de naissance. Ainsi, les cas représentent 88 nouveau-nés à faible poids de naissance (âge gestationnel  $\geq 37$  semaines, poids  $< 2\,500$ g), 113 nouveau-nés de poids normal ( $\geq 2\,500$  g et âge gestationnel  $\geq 37$  semaines) constituant le groupe témoin. Des prélèvements de sang du cordon, du méconium et du sang maternel ont été effectués. Trois phtalates (DEP, DBP et DEHP) et deux de leurs métabolites (MBP et MEHP) ont été recherchés dans le sang du cordon et le méconium ainsi que dans le sang maternel. Plus de 70 % des échantillons ont des niveaux quantifiables de phtalates. Seuls le MBP et le MEHP ont été détectés dans le méconium. Des concentrations plus élevées de DBP et MEHP ont été retrouvées dans le sang du cordon des nouveau-nés de petits poids, comparé au groupe à poids normal (Le groupe des nouveau-nés de petits poids a respectivement des médianes de 2,7 mg/l versus 1,8 mg/l,  $p < 0,01$  et 2,5 mg/l versus 1,1 mg/l,  $p < 0,001$ ). Dans le méconium, les valeurs de MBP et MEHP sont deux fois plus élevées dans le groupe de petit poids comparé au groupe témoins ( $p < 0,005$ ). Après prise en compte des possibles variables de confusion, les auteurs suggèrent que l'exposition au DBP *in utero* (sang cordon, méconium) est associée à un plus faible poids de naissance et l'exposition au DEHP avec une taille plus petite. Le fait d'être dans le 4<sup>e</sup> quartile pour le DBP et le MEHP dans le sang du cordon augmente le risque d'avoir un poids de naissance inférieur à 2 500g (respectivement OR=3,54 [1,54-6,15]  $p=0,008$  ; OR=2,05 [1,17-3,70]  $p=0,05$ ). Dans le méconium ce risque est également augmenté pour le MBP (OR=4,66 [2,14-6,85]  $p < 0,001$ ) et le MEHP (OR=3,23 [1,31-5,94]  $p=0,04$ ). Les auteurs concluent que l'exposition à ces phtalates est associée, avec un effet dose, à un plus bas poids de naissance chez le nouveau-né (Inserm, 2011).

## 2) Etudes chez l'animal

De nombreuses études de la reprotoxicité des phtalates chez l'animal ont été réalisées. Seules les études présentant des effets aux faibles doses, plus susceptibles d'être utilisées pour dériver une valeur de référence sont détaillées dans ce rapport. Elles sont rapportées selon le type d'effets (effets sur la fertilité, effets sur le développement) et les périodes d'exposition (exposition adulte, pendant la grossesse ou sur plusieurs générations). Les éléments décrivant les études rapportées dans cette partie sont pour la plupart issus du rapport d'expertise collective Inserm (2011).

### a) Effets sur la fertilité

- Chez le mâle adulte

Plusieurs types d'effets sont observés après une exposition à certains phtalates : des effets testiculaires à la fois structuraux et fonctionnels, ainsi qu'une diminution de la fertilité mâle consécutive probablement à ces effets. La plupart des études dans lesquelles des effets testiculaires ont été décrits sont de type mono dose et de durée d'exposition variable (de 7 jours à 90 jours). Parmi les effets testiculaires décrits figurent, entre autre, une diminution du poids des testicules, des glandes sexuelles accessoires, une dégénérescence des tubes séminifères, une diminution du taux de zinc et de fer testiculaire, une diminution du taux de testostérone sanguine mais une augmentation du taux de testostérone testiculaire, une hyperplasie des cellules interstitielles, une diminution du nombre de spermatoocytes, un décollement des cellules germinales, une diminution de l'activité enzymatique des cellules de Sertoli (succinate déshydrogénase) et une augmentation de l'excrétion urinaire du zinc.

Dans l'étude de Srivastava *et al.* (1990a), des jeunes rats mâles (âgés de 5 semaines) ont été exposés par gavage pendant 15 jours à du DBP aux doses de 250, 500 et 1000 mg/kg/j (n = 6/ groupe). Seule la fonction testiculaire a été investiguée dans cette étude. Une diminution du poids absolu et relatif des testicules a été rapportée aux doses de 500 et 1000 mg/kg/j. Au niveau histologique, une dégénérescence des tubules séminifères ainsi qu'une modification de l'activité enzymatique des spermatogonies et des cellules de Sertoli ont été observées à toutes les doses. Un LOAEL de 250 mg/kg/j peut donc être déduit de cette étude. Une seconde étude de Srivastava *et al.*, (1990b) chez des rats mâles adultes conduite selon le même protocole (doses et durée d'exposition) a permis de mettre en évidence les effets précédemment cités (dégénérescence des tubules séminifères, modification de l'activité enzymatique des spermatogonies et des cellules de Sertoli à partir de 500 mg/kg/j à l'exception de ceux concernant le poids des testicules. Une diminution du nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme a également été rapportée à partir de 500 mg/kg/j. Un LOAEL de 500 mg/kg/j peut donc être déduit de cette étude.

Concernant les effets sur les paramètres de qualité de sperme, Wang *et al.* ont administré par gavage des doses de DBP de 0 – 250 – 500 ou 1 000 mg/kg/j à des rats Sprague Dawley mâles adultes âgés de 6 semaines (8 / groupes) durant 4 semaines (Wang *et al.*, 2004). Des signes de toxicité sont apparents pour tous les rats traités au DBP (augmentation significative du poids du foie pour toutes les doses). Une réduction significative de la mobilité du sperme issu de l'épididyme est constatée pour la plus forte dose. Toujours pour cette dose, une diminution significative de l'activité testiculaire de la superoxyde dismutase (SOD) est observée, indiquant que le DBP entraîne une dégradation du système de défense contre les radicaux libres. A contrario, le niveau d'activité sérique de SOD apparaît inchangé.

Une diminution du poids des vésicules séminales, de la prostate ventrale, des épидидymes et des testicules a été observée chez des rats Sprague Dawley traités par gavage pendant 30 jours avec du DBP aux doses de 100 et 500 mg/kg/j. Cet effet est moins prononcé chez les rats chez qui une hypothyroïdie a été induite par l'injection de propylthiouracyl (PTU) (Lee *et al.*, 2008). L'hypothyroïdisme pourrait ainsi protéger en partie les rats des effets du DBP. Chez les rats PTU, une forte diminution de la métabolisation du DBP en MBP est observée (de près de la moitié). Une réduction de poids testiculaire est observée aussi bien chez les rats normaux et hypothyroïdiens (PTU) en réponse au DBP. Il est donc difficile d'être certain que l'hypothyroïdisme protège le testicule des effets néfastes du DBP mais l'effet sur le métabolisme de ce phtalate apparaît clair.

Une exposition à 500 mg/kg de DBP induit rapidement chez le rat Sprague-Dawley une diminution de l'expression des enzymes de biosynthèse de la testostérone et de la testostéronémie dans les heures qui suivent le traitement (Alam *et al.*, 2010). Après 7 jours d'exposition quotidienne le taux de testostérone des rats exposés est redevenu semblable à celui des rats témoins. Cet effet inhibiteur sur la stéroïdogénèse apparaît donc très temporaire. Dans la même étude, les auteurs observent une augmentation de l'apoptose des spermatoocytes au sein des tubes séminifères à la fois dans les heures suivant le début du traitement et après 7

jours. Cet effet sur la spermatogenèse semble donc plus durable. De manière intéressante, seul l'effet sur la spermatogenèse est bloqué par un antagoniste des oestrogènes. Les effets des phtalates sur la gamétogenèse et la stéroïdogenèse peuvent donc être dissociés.

A partir de la puberté, les cellules de Sertoli ont définitivement cessé de proliférer et les variations de poids testiculaires reflètent essentiellement une atteinte germinale sans pour autant que celle-ci ait été recherchée par tous les auteurs.

**Selon l'Inserm (2011), il semble que les effets des phtalates chez le rat pubère sur la sécrétion d'androgènes apparaissent très variables. A forte dose, il est probable qu'ils réduisent celle-ci, diminuant de ce fait la croissance des organes reproducteurs mâle. Des différences liées à la souche de rat employée existent: la souche Sprague-Dawley semble plus sensible aux lésions testiculaires affectant la spermatogenèse.**

**Chez l'adulte (plus de 60 jours), les effets des phtalates sur le testicule semblent peu prononcés à moins d'une exposition à de très fortes doses. Ainsi Nair et al. (2008) relatent que 1000 mg/kg/j de DBP administrés durant 7 jours à des rats adultes diminuent le taux de testostérone plasmatique et la densité et la viabilité des spermatozoïdes. Dans cette étude, les protocoles sont peu détaillés rendant difficile l'appréciation de la méthodologie.**

**Il semble donc que le testicule adulte de rat ou de lapin soit beaucoup moins sensible aux effets d'une exposition aux phtalates que le testicule fœtal ou postnatal.**

Chez l'adulte, une étude intéressante a été menée avec des rats Sprague-Dawley castrés et supplémentés en testostérone artificiellement (Lee et Koo, 2007), exposés à différents phtalates pendant 10 jours aux doses de 0, 20, 10 et 500 mg/kg/j. Chez ces animaux, le DBP, le DEHP, le DINP, le DIDP et le MEHP diminuent le poids des vésicules séminales, de la prostate ventrale et des autres organes reproducteurs mâles. Des effets sont observés dès la dose de 20 mg/kg/j. En revanche le di-n-heptyl-phtalate (DnHP) et le BBzP semblent inefficaces dans ce modèle. Cette étude est intéressante car elle décrit un effet anti-androgénique des phtalates indépendant de l'inhibition de la synthèse de testostérone testiculaire. Les phtalates pourraient donc agir directement sur le tractus reproducteur mâle indépendamment de leur effet sur la stéroïdogenèse testiculaire et inhiber la croissance androgéno-dépendante de celui-ci (Inserm, 2011).

Des publications récentes ont mis en exergue les modifications du matériel génétique et de son expression (perturbations endocriniennes) chez les rats adultes mâles, processus susceptibles d'altérer significativement la fertilité masculine. L'équipe de Ryu et al. a ainsi montré que l'administration de DBP (0 – 250 – 500 ou 750 mg/kg/j durant 30 jours) à des rats Sprague Dawley âgés de 4 semaines engendrait une altération de l'ARN testiculaire concernant notamment les gènes impliqués dans la spermatogenèse et stéroïdogenèse (Ryu et al., 2007). Pour la plus forte dose (750 mg/kg/j), l'expression des gènes associés à la stéroïdogenèse (PBR, SR-B1, StAR, P450scc, and CYP17) est fortement accrue à l'inverse du gène CYP19I. A ce niveau de dose (750 mg/kg/j) l'expression des récepteurs hormonaux (TR-alpha1) et des récepteurs activables par les proliférateurs de peroxyosomes gamma (PPAR-gamma) est significativement augmentée dans les testicules tandis que les taux hormonaux (androgène et œstrogène) sont significativement diminués. La connaissance des liens complexes entre ces perturbations endocriniennes et la fertilité masculine est encore lacunaire comme l'illustrent ces auteurs dans une étude ultérieure où les résultats suggèrent l'existence de mécanismes distincts entre exposition aiguë et chronique (Ryu, 2008).

- Chez la femelle adulte

Aucune étude mettant en évidence un lien entre une exposition au DBP à des femelles adultes non gestantes et des effets sur le système reproducteur n'a été identifiée.

- Etudes multigénérationnelles

Une étude de fertilité a été réalisée chez le rat COBS CD dans des conditions BPL (IRDC, 1984). Les mâles ont été exposés *via* l'alimentation, 60 jours avant l'accouplement, les femelles 14 jours avant l'accouplement puis pour les 2 sexes, pendant la période d'accouplement, la gestation et la lactation à des doses de 0, 5, 50 et 500 mg/kg/j. Des femelles F1 issues de mères exposées ont été elle-même directement exposées au DBP pendant 7 semaines supplémentaires après le sevrage ; un groupe contrôle recevait de la nourriture sans DBP. Chez les rats mâles F0 exposés, seules des augmentations du poids du foie et des reins ont été rapportées; statistiquement significatives à 500 mg/kg/j. Aucun effet sur la fertilité ou sur la descendance issue de ces rats mâles exposés n'a été observé. Chez les femelles F0 traitées, une augmentation du poids des rats a également été observée. Le poids des petits issus de mères traitées à la dose de 500 mg/kg/j est diminué à la naissance et pendant la lactation. Une diminution du poids des testicules ainsi que des lésions histologiques ont également été observés 7 semaines après le sevrage. Une NOAEL de 50 mg/kg/j basée sur la toxicité maternelle et l'embryotoxicité peut être déduite de cette étude.

Dans une étude par voie orale, des souris mâles et femelles ont été traitées avec du DBP 7 jours avant l'accouplement et 98 jours depuis la mise en accouplement aux doses de 40, 420 et 1410 mg/kg/j dans l'alimentation (20 mâles et 20 femelles / groupes; 40 par sexe pour le groupe contrôle). Après 98 jours, les mâles et femelles ont été séparées et ont continué à recevoir du DBP jusqu'au maximum 21 jours après la mise bas. Une diminution du poids des souris mâles et une augmentation du poids du foie des souris femelles a été observée à la plus forte dose. Dans le groupe exposé à la plus forte dose, une diminution de la fertilité (nombre de couples fertiles, nombre de portées, nombre de petits nés vivants par portée) est observée. Les souris traitées à la plus forte dose ont alors été accouplées avec des souris de l'autre sexe non exposées. Cette étude a permis de montrer que la baisse de la fertilité observée était due aux femelles (Lamb, 1987 ; Morissey, 1989). Un NOAEL de 420 mg/kg pour la toxicité maternelle et l'embryotoxicité peut être déduit de cette étude

Une étude, sur deux générations (Wine, 1997), a été réalisée chez des rats Sprague-Dawley exposés en alimentation continue à 52, 256 et 509 mg/kg/j chez les mâles et 80, 385 et 794 mg/kg/j chez les femelles. Les indices d'accouplement, de gestation et de fertilité de la génération F1 sont inférieurs à ceux de F0 à la dose la plus forte. Le poids corporel des femelles gestantes diminue en fonction de la dose jusqu'à atteindre une diminution de 13% à la plus forte dose au moment de la délivrance et de la lactation. Le nombre de petits par portée est diminué à toutes les doses et le poids moyen à la naissance et pendant la lactation est diminué aux deux plus fortes doses. A partir de 256 mg/kg/j chez les mâles et 385 mg/kg/j chez les femelles, de nombreuses anomalies des organes reproducteurs sont observées (diminution du poids de ces organes, lésions dégénératives de l'épithélium germinale testiculaire, hyperplasie interstitielle, absence ou hypoplasie de l'épididyme). Les effets au niveau de la seconde génération (F2) sont identiques mais plus sévères et apparaissent aux premières doses testées, dès 52 mg/kg/j pour les mâles et 80 mg/kg/j pour les femelles (en l'absence de toxicité maternelle pour la première dose testée). Aucun NOAEL n'a pu être identifié pour la génération F2. Cette étude examine des effets plus sensibles, notamment au niveau testiculaire, non recherché dans d'autres études.

Dans une autre étude, de type multigénérationnelle, l'administration orale par gavage de DBP (250, 500 et 1 000 mg/kg par jour) à des rats mâles Long Evans accouplés avec des femelles non-traitées montre une forte réduction de la fertilité aux doses de 500 et 1 000 mg/kg par jour attribuée à une atrophie testiculaire et à une réduction de la production de sperme (Gray et al., 1999). Chez les descendants F1 exposés uniquement *in utero* et pendant la lactation *via* l'exposition des mères (même gamme de doses) on note des malformations urogénitales (hypospadias, aberration de migration testiculaire, agénésies des épидидymes et des reins, anomalies utérines) et des anophtalmies. Chez les mâles F1 accouplés à des femelles non traitées au DBP, la fécondité est réduite. Le LOAEL pour les effets sur la fertilité est de 250 mg/kg.

Dans une étude plus récente de la même équipe, chez le rat femelle Long Evans, l'exposition par gavage à 250, 500 et 1 000 mg /kg/jour de DBP depuis le sevrage (21 jours postnatal) jusqu'à l'âge adulte (femelles gravides), induit une réduction de la fertilité de ces animaux (Gray et al., 2006). Le pourcentage de femelles donnant naissance à des petits vivants est réduit de plus de 50 % à 500 mg/kg/jour et de 90 % à 1 000 mg/kg/jour. Les autres paramètres mesurés comme l'âge de l'ouverture vaginale et du premier œstrus, la cyclicité et l'indice de conception (nombre de femelles saillies/ nombre de femelles accouplées et nombre de femelles gestantes/nombre de femelles saillies) ne sont pas significativement affectés par l'exposition au DBP. Les dosages de progestérone dans le sérum des femelles en gestation ainsi que ceux des hormones produites par les ovaires des femelles au 13ème jour de gestation révèlent une altération fonctionnelle du corps jaune et de la synthèse de progestérone. Ceci est en accord avec la présence de corps jaunes hémorragiques sur les ovaires. Il est fait l'hypothèse que l'administration de 500 et 1 000 mg/kg/jour à des rats femelles entraîne une production insuffisante de progestérone ovarienne à la mi-gestation pour maintenir une gestation pendant cette phase critique (Inserm, 2011).

**En conclusion, concernant les effets du DBP sur la fertilité, cette dernière est affectée chez les souris femelles à la dose de 1410 mg/kg par voie orale au cours d'une étude sur une génération ; une embryotoxicité est observée à cette dose. Un NOAEL de 420 mg/kg/j peut être déduit de cette étude, basée sur la toxicité maternelle et l'embryotoxicité (Lamb, 1987; Morissey, 1989).**

**Chez le rat femelle, un NOAEL de 50 mg/kg/j sur la base d'une embryotoxicité observée dans une étude sur une génération peut être établie; un NOAEL de 500 mg/kg/j peut être dérivé de cette étude pour les rats males (IRDC, 1984).**

**Enfin, dans une étude sur 2 générations chez le rat avec une exposition continue des males et des femelles, un LOAEL de 52 mg/kg/j peut être dérivé basée sur une embryotoxicité en absence de toxicité maternelle (NTP, 1995 ; Wine et al., 1997).**



**Tableau 20: Récapitulatif des études expérimentales chez l'animal sur les effets reprotoxiques du DBP**

1.1.1.1.1.1.1								
Animal	Type (protocole)	d'étude	durée	animaux /groupe	NOAEL	LOAEL	Effet	Source
Rat	Subchronique (NR)	Orale	90 jours	NR		250 mg/kg/j	Changement enzymatique testiculaire associé à la dégénérescence et b spermatogénique	Srivastava, 1990a
Rat LE	Multigénérationnelle (NR)	In utero et lactation	et indéterminé	16		250 mg/kg/j	Réduction de la fertilité F0 et chez les descendants F1 exposés uniquement pendant la gestation et la lactation via l'exposition des mères	Gray, 1999
Rat SD	Reproduction sur générations (NR)	2 Orale continue de F0 à F1	indéterminé	NR	385 mg/kg/j		Diminution du poids des mères F0	Wine, 1997
Rat LE	Avortement (NR)	Orale	Naissance à 1 <sup>er</sup> gestation	NR	250 mg/kg/j	500 mg/kg/j	- 50 % de petit par portée (production d'hormones ovarienne insuffisante)	Gray, 2006
Rat SD	Effets testiculaires chez le jeune mâle (6s) (NR)	Orale	4 semaine	8	500 mg/kg/j	1000 mg/kg/j	Réduction de la mobilité des spermatozoïdes	Wang, 2004
Souris CD-1	Fertilité des mâles (NR)	Orale	NR	NR	420 mg/kg/j		Réduction de la fécondité des mâles accouplés à des femelles non exposées (nombre de couple fertile, nombre de petit par portée).	Lamb, 1987 ; Morissey, 1989

- Sur le développement par exposition *in utero*

- *Effets in utero*

**La grande majorité des effets résultant d'une exposition *in utero* chez l'animal concernent le testicule fœtal et ont été observés lors d'études par gavage. Ces études rapportent des effets sur les trois principaux types cellulaires du testicule : cellules de Leydig, cellules de Sertoli et cellules germinales. De nombreux travaux signalent de manière cohérente : une agrégation des cellules de Leydig et la diminution de la production de testostérone et d'Insl3 (relaxin/insuline like 3) de ces cellules; une augmentation du diamètre des cordons testiculaires; l'apparition de gonocytes (cellules germinales fœtales) multinucléés (Inserm, 2011).**

Une étude du groupe de Sharpe (Mahood et al., 2007) a recensé différents paramètres affectés par une exposition strictement fœtale (du jour 13 à 21) tout au long de l'organogenèse testiculaire en réponse à différentes doses de DBP de 4 à 500 mg/kg/j administrées par gavage. Les paramètres précoces tels que la formation d'aggrégats de cellules de Leydig, l'apparition de gonocytes multinucléés et la sécrétion de testostérone analysés en fin de vie fœtale (jour 21) sont altérés significativement dès la dose de 100 mg/kg/j. Des paramètres mesurés plus tardivement (adulte) tels que les mesures de fertilité et le taux de cryptorchidisme ne sont affectés qu'à la dose de 500 mg/kg/j. Cette étude révèle également que la disparition de l'épithélium germinal dans certains tubules et l'apparition de foyers dysgénésiques (aggrégat mal ordonné de plusieurs types cellulaires différents) est retrouvée dans des testicules scrotaux dès la dose de 100 mg/kg/j. Pour plusieurs paramètres, une tendance (non significative) est observée à la dose de 20 mg/kg/j peut-être du fait du nombre modéré de portées analysées (5 à 9). Cette étude est très détaillée et axée spécifiquement autour du développement testiculaire. Les auteurs proposent que les paramètres mesurés en fin de vie fœtale soient les meilleurs indices reflétant une exposition aux phtalates (Inserm, 2011).

Concernant les cellules de Leydig, chez le rat Wistar, l'administration de 500 mg/kg/j de DBP à la femelle gestante diminue la testostérone intra-testiculaire du fœtus de manière importante (Fisher et al., 2003, Scott et al., 2008, Drake et al., 2009, Martino-Andrade et al., 2009, MacLeod

et al., 2010) alors que des doses de DBP inférieures à 100 mg/kg/j n'inhibent pas de manière visible la production de testostérone durant la vie fœtale (Drake et al., 2009 et Martino-Andrade et al., 2009). Cependant l'administration simultanée de DBP (100 mg/kg/j) et de DEHP (150 mg/kg/j) induit des effets semblables à une forte dose de DBP (Martino-Andrade et al., 2009).

Struve et al. (2009) ont montré que le DBP mélangé à l'alimentation de femelles gestantes du 12<sup>e</sup> au 19<sup>e</sup> jour de la gestation diminue la testostérone intra-testiculaire, dès des doses équivalentes à 100 mg/kg/j chez le rat Sprague-Dawley. Une administration sous forme de bolus quotidiens de DBP par gavage ou intubation gastrique, conduit à des effets comparables à ceux observés suite à une exposition via la nourriture à dose équivalente. Toujours dans cette souche, le DBP ou le DEHP à la dose de 500 mg/kg/j chacun diminuent la sécrétion de testostérone et leurs effets peuvent se cumuler lorsqu'ils sont administrés du 14<sup>e</sup> au 18<sup>e</sup> jour de gestation (Howdeshell et al., 2007).

Le groupe de Richard Sharpe a recherché sur des femelles Wistar gestantes la fenêtre pendant laquelle le DBP administré par gavage à la dose 500 mg/kg/j réduit la production de testostérone fœtale. La testostéronémie chute fortement à partir du 17<sup>e</sup> jour de gestation et cette diminution se maintient jusqu'au 21<sup>e</sup> jour de gestation lors d'une exposition du 13<sup>e</sup> au 21<sup>e</sup> jour (MacLeod et al., 2010). Ils ont également montré qu'une courte exposition du 19<sup>e</sup> au 20<sup>e</sup> jour est suffisante pour inhiber la sécrétion de testostérone au jour 21 (Scott et al., 2008). Cependant, lors d'une exposition du 13<sup>e</sup> au 15<sup>e</sup> ou du 15<sup>e</sup> au 17<sup>e</sup>, aucune diminution de la testostéronémie au jour 21 n'a été observée. Il apparaît donc que les effets sur la production de testostérone fœtale disparaissent rapidement après l'arrêt du gavage.

**Il semble donc largement prouvé que le DBP administré aux rates gestantes inhibe l'activité stéroïdogène du testicule fœtal dans diverses souches de rats (Inserm, 2011). Si des fenêtres de susceptibilité au cours de la gestation ont pu être identifiées, il convient de souligner que la plupart des études ayant suivi la production de testostérone pendant la vie postnatale semble s'accorder sur le fait qu'à l'âge adulte, les taux plasmatique de testostérone des mâles exposés *in utero* sont comparables à ceux d'animaux non exposés (Inserm, 2011).**

**Les conséquences d'une inhibition de la synthèse de testostérone fœtale ont été clairement identifiées. Ainsi différents défauts de masculinisation sont décrits: une diminution de la distance anogénitale, la rétention d'aréoles mammaires ou de mamelons chez le mâle, la diminution de la longueur du pénis, une baisse du poids de la prostate, une augmentation des hypospadias et du taux de cryptorchidie. Une diminution de la distance anogénitale a été observée à des doses qui concordent généralement avec les effets observés sur la sécrétion de testostérone (de 250 à 750 mg/kg/j) chez le rat (Inserm, 2011).**

Deux études ont délimité finement la période d'exposition minimale induisant une diminution de la distance anogénitale (Ema et al., 2001, Scott et al., 2008); cette période du 15<sup>e</sup> au 17<sup>e</sup> jour de gestation correspond à la « fenêtre de programmation mâle », un concept proposé par R. Sharpe. Ainsi chez le rat Wistar, une exposition au DBP (150-500 mg/kg/j) durant toute la fin de la vie fœtale (du 13<sup>e</sup> au 21<sup>e</sup> jour) ou uniquement pendant la fenêtre du 15<sup>e</sup> au 17<sup>e</sup> jour diminue sensiblement également la distance anogénitale bien que dans le second cas la chute de la sécrétion de testostérone ait été très transitoire. La différenciation et le développement de nombreux organes du tractus reproducteur mâle sont androgéno-dépendants. Ainsi une diminution à la puberté ou à l'âge adulte du poids des vésicules séminales, de la prostate ventrale et du muscle levator ani-bulbocaverneux sont couramment signalés dans ces études. Un retard de l'âge de la séparation du prépuce, un indice de la puberté chez le mâle, est parfois rapporté. Une diminution du poids testiculaire ou épидидymaire est également fréquemment

décrite mais il n'est pas établi si celle-ci fait suite à une atteinte directe du testicule ou est secondaire à la cryptorchidie (Inserm, 2011).

**Une autre hormone produite par les cellules de Leydig durant la vie fœtale, l'InsL3 (relaxin/insulin like 3) apparaît comme inhibée lors d'une exposition *in utero* aux phtalates. La diminution de l'expression de ce gène pendant la vie fœtale ou néonatale a été décrite pour des doses de 200 à 750 mg/kg/j chez les trois souches de rats en réponse à une exposition *in utero* au DIBP, au DEHP ou au DBP (Howdeshell et al., 2007, Johnson et al., 2008). Cette hormone permet entre autre la croissance du gubernaculum, un ligament responsable de la descente des testicules. Il semble donc logique d'attribuer, au moins en partie, la cryptorchidie induite par une exposition *in utero* aux phtalates à l'inhibition de la sécrétion de cette hormone leydigienne.**

**Enfin des cas drastiques d'agénésies épидидymaires sont rapportés en réponse aux phtalates *in utero* : 82 % chez les rats de souches Sprague-Dawley contre 12 % chez les rats Wistar en réponse à 500 mg/kg/j de DBP (Howdeshell et al., 2008).**

Pour déterminer la relation dose réponse des effets du DBP sur la genèse stéroïdienne dans les testicules fœtaux, des rates Sprague-Dawley gestantes ont reçu du DBP par gavage avec de l'huile de maïs aux doses de 0,1 ; 1,0 ; 10 ; 50 ; 100 ou 500 mg/kg/j depuis le 12<sup>e</sup> jour de gestation jusqu'au 19<sup>e</sup> jour. Les testicules des fœtus mâles ont été isolés le 19<sup>e</sup> jour et les changements d'expression de gène ont été évalués quantitativement par PCR en temps réel. La concentration de testostérone testiculaire fœtale a été mesurée par un test radio immunologique. L'exposition au DBP génère une réduction dose dépendante significative des concentrations de mRNA et de protéine du récepteur « scavenger », de la protéine régulatrice des stéroïdes (StAR), du cytochrome P450, du 3beta-hydroxysteroïde déshydrogénase et du cytochrome P450c17. La quantité/concentration de testostérone testiculaire a été réduite à partir de 50 mg/kg/j. Ces résultats montrent une réduction dose dépendante de l'expression des gènes clés et des protéines impliquées dans le transport du cholestérol et dans la genèse stéroïdienne accompagnée d'une réduction de la testostérone dans les testicules fœtaux après exposition maternelle à des niveaux de dose inférieurs aux niveaux où des effets indésirables sont détectés sur les organes reproducteurs mâles en développement. Les changements observés (expression de gène et de protéine) peuvent servir d'indicateurs précoces de la réponse testiculaire aux DBP (Lehmann et al., 2004).

**Contrairement aux modèles rats, d'autres modèles animaux ont été assez peu étudiés.**

Gaido et al. (2007) ont étudié en détail les effets des phtalates chez la souris. Trois souches de souris différentes, CD1, C57Bl/6J et C3H/HeJ, ainsi que trois phtalates ont été utilisés, DBP, MBP et MEHP. Les gavages ont été réalisés pendant la gestation (18<sup>e</sup> jour, 15<sup>e</sup>-16<sup>e</sup> jour, 15<sup>e</sup>-17<sup>e</sup> jour et 14<sup>e</sup>-17<sup>e</sup> jour) avec des doses de 250 à 1500 mg/kg/j. Les protocoles utilisés sont semblables à ceux décrits chez le rat. Cependant aucune diminution de la testostérone testiculaire fœtale n'a pu être observée par ces auteurs, quelle que soit la dose, la nature du phtalate ou la souche de souris. Par exemple, une exposition à 1 500 mg/kg/j de DBP (14<sup>e</sup> -16<sup>e</sup> jour) ne diminue pas la production de testostérone dans la souche C57Bl/6J. Par ailleurs, aucune diminution des ARNm de StAR, P450scc, Cyp17a1 ou Srb1 n'est observée. Les auteurs ont également mesuré le taux de MBP, lors d'une exposition au DBP, dans le plasma fœtal et maternel et observe des doses similaires à celles décrites chez le rat. Ce point indique donc que la métabolisation du phtalate ne semble pas être différente chez ces deux espèces. Il apparaît donc que chez la souris, les gènes impliqués dans le transport du cholestérol et la biosynthèse de la testostérone, ne sont pas affectés par une exposition *in utero* aux phtalates. Ce travail pose

la question de savoir si les effets observés chez le rat sont spécifiques de cette dernière espèce (Inserm, 2011).

**En résumé, de très nombreux travaux ont démontré qu'une exposition *in utero* à des fortes doses d'un phtalate altère de manière importante la morphologie et la fonction des cellules de Leydig de rat. Celle-ci inhibe la sécrétion des deux principales hormones: InsL3 et testostérone pendant la vie fœtale chez le rat et donc la masculinisation ou le développement des organes reproducteurs androgéno-dépendant. Cet effet semble, au moins en partie, conservé chez le lapin mais est absent chez la souris, posant ainsi la question de savoir quel est le modèle animal le mieux adapté pour prédire les effets chez l'Homme. Chez le rat, d'importantes différences ont été observées en fonction de la souche ou sous-souche suggérant une composante importante du fond génétique. Enfin il est encore incertain si ces effets anti-androgéniques sont uniquement dépendants d'une exposition à de fortes doses ou si ces effets peuvent se manifester à des doses beaucoup plus faibles chez certains animaux ou lors d'une exposition à un mélange de divers phtalates ou/et de facteurs anti-androgéniques. Quelques travaux suggèrent que tel pourrait être le cas mais ceux-ci sont encore à confirmer (Inserm, 2011).**

Concernant les cellules de Sertoli, plusieurs études du groupe de R. Sharpe ont décrit des effets sur ce type cellulaire lors d'une exposition *in utero*. Le modèle utilisé par ce groupe est essentiellement le rat Wistar gavé au DBP (500 mg/kg/j) pendant la gestation (Fisher et al., 2003, Scott et al., 2008 et Auharek et al., 2010). Dans ce modèle, un gavage pendant toute l'organogenèse testiculaire (13<sup>e</sup> au 21<sup>e</sup> jour de gestation) induit une chute importante, de l'ordre de 50%, du nombre de cellules de Sertoli en fin de gestation mais dès la puberté (25 jours) et à l'âge adulte (90 jours), ce nombre est restauré (Fisher et al., 2003). Les cellules de Sertoli apparaissent donc comme un second type testiculaire sensible aux effets des phtalates *in utero*. Le même groupe a démontré que la prolifération des cellules de Sertoli est réduite en réponse à une exposition aux phtalates *in utero* (Scott et al., 2008). En faisant jouer la fenêtre d'exposition les auteurs indiquent qu'une exposition en toute fin de vie fœtale (19<sup>e</sup>-20<sup>e</sup> jour de gestation) suffit pour diminuer le nombre de cellules de Sertoli alors qu'une exposition plus précoce (15<sup>e</sup> au 17<sup>e</sup> jour de gestation) est sans effet sur ce paramètre. Il semble donc que la fenêtre de sensibilité des cellules de Sertoli se situe un peu après celle décrite pour la distance anogénitale. De plus, l'inhibition de la prolifération des cellules de Sertoli apparaît corrélée à l'inhibition de la synthèse de testostérone induite par le DBP. Cette diminution persiste à la puberté si l'exposition aux phtalates *in utero* est poursuivie par une exposition via la lactation jusqu'au 15<sup>e</sup> jour postnatal. Cette diminution de la prolifération des cellules de Sertoli semble être la cause de la diminution du poids testiculaire à la naissance lors d'une exposition aux phtalates pendant la gestation rapportée par de nombreux auteurs et également retrouvée chez le lapin (Inserm, 2011).

**En résumé, le nombre et la prolifération des cellules de Sertoli peuvent être inhibés transitoirement lors d'une exposition *in utero* aux phtalates chez le rat. Il est encore incertain si cet effet des phtalates résulte d'une atteinte directe de ces cellules ou par un effet indirect *via* l'inhibition de la synthèse d'androgènes. Le modèle murin, qui ne présente pas d'inhibition de la production de testostérone, n'a que peu été étudié vis-à-vis des cellules de Sertoli lors d'une exposition gestationnelle aux phtalates. Seule une augmentation du diamètre des cordons testiculaire est rapportée en fin de vie fœtale (Gaido et al., 2007). Cet effet a également été décrit chez le rat mais bien qu'attribué aux cellules de Sertoli, cet effet pourrait également être le fait d'une atteinte germinale (l'autre composante des cordons) (Inserm, 2011).**

Concernant les cellules germinales, le phénomène le plus visible immédiatement après une exposition *in utero* aux phtalates est l'apparition de cellules germinales anormales,

**multinucléées. Ces cellules ont été décrites chez le rat et la souris dans diverses souches et principalement en réponse au DBP et au DEHP (Fisher et al., 2003, Borch et al., 2005, Gaido et al., 2007, Jonhson et al., 2008, Boekelheide et al., 2009, Martino-Andrade et al., 2009). Il semble que des doses supérieures ou égales à 100 mg/kg/j soient nécessaires pour induire l'apparition de ces gonocytes multinucléés. Ces cellules sont observées en fin de vie fœtale et disparaissent peu après la naissance vers 10 jours (Fisher et al., 2003). A cet âge, une diminution du nombre des cellules germinales est observée. Les mécanismes moléculaires impliqués sont totalement inconnus mais un lien avec la chute du taux de testostérone peut clairement être exclu puisque cet effet est retrouvé chez la souris.**

Peu d'études ont détaillé la prolifération ou l'apoptose des cellules germinales fœtales. Dans ce cadre, l'étude de Ferrara et al. (2006) revêt un intérêt particulier car elle décrit un retard de la différenciation mâle des cellules germinales fœtales chez le rat en réponse à une exposition au DBP. Une étape importante du développement de la lignée germinale mâle chez les rongeurs est l'apparition d'une phase de quiescence caractéristique en fin de vie fœtale. C'est durant cette phase que l'empreinte parentale se met en place. Les auteurs ont gavé des rates Wistar avec 500 mg/kg/j de DBP à partir du 13<sup>e</sup> jour de gestation et rapportent alors une augmentation de l'expression d'OCT4, de PRb, de Ki67 dans les cellules germinales, des marqueurs de «multipotence» et de prolifération qui disparaissent en temps normal lors de l'entrée en quiescence. Ce maintien de cellules indifférenciées s'accompagne également d'une augmentation de l'apoptose (d'un facteur 2 à 4) des cellules germinales dès le 15<sup>e</sup> et 17<sup>e</sup> jour de gestation. Les auteurs rapportent que l'apparition de gonocytes multinucléés (augmentation d'un facteur 10) est plus tardive, dès le 21<sup>e</sup> jour de gestation, et dissociable du phénomène du retard de différenciation. En effet une exposition au DBP, pendant la phase de quiescence, (19<sup>e</sup> -20<sup>e</sup> jour de gestation) suffit à induire l'apparition de cellules multinucléées. Les auteurs identifient également que seul l'effet précoce du DBP (13<sup>e</sup>-20<sup>e</sup> jour de gestation) retardant l'entrée en quiescence réduit le nombre de cellules germinales de manière conséquente, 37% au jour 21 de gestation; 53% au 4<sup>e</sup> jour postnatal et 80% entre le 8<sup>e</sup> et 15<sup>e</sup> jour postnatal. Cette réduction reste transitoire puisque ce nombre est restauré entre 25 et 80 jours postnatales du fait d'une augmentation de la prolifération des cellules germinales postnatales (Inserm, 2011).

**Cet effet précoce d'une exposition aux phtalates est particulièrement intéressant car il est actuellement admis qu'une non-différenciation de certains gonocytes pourrait être à l'origine des carcinomes *in situ* (CIS) testiculaires avec lesquels ils partagent de nombreux marqueurs communs. Aucun CIS n'a toutefois été décrit chez le rat adulte après une exposition *in utero* aux phtalates (Inserm, 2011).**

Très peu d'études ont analysé la fertilité, une fois adulte, des mâles exposés *in utero*. Fisher et al. (2003) rapportent que seuls 2 rats sur 10 sont fertiles après une exposition *in utero* au DBP (500 mg/kg/j) mais dans cette même étude presque tous les animaux présentent une cryptorchidie uni- ou bilatérale. Il est donc probable que cette stérilité soit secondaire à la cryptorchidie. De manière plus intéressante, le poids du testicule à l'âge adulte n'est pas diminué dans les testicules non-cryptorchides dans cette étude. Globalement, la spermatogenèse semble donc prendre place après une exposition *in utero* mais quelques altérations subtiles ont été décrites (Inserm, 2011).

Dans une étude sur des primates non humains, Mc Kinell et al. (2009) ont exposé des femelles marmouset gestantes à 500 mg/kg/j de MBP entre la 7<sup>e</sup> et la 15<sup>e</sup> semaine de gestation, période durant laquelle se mettent en place les tubes séminifères et débute la sécrétion de testostérone; 6 mâles ont été autopsiés à la naissance, 5 durant la vie adulte (18- 21 mois). Par ailleurs dans un deuxième protocole, ils ont exposé des nouveau-nés (4<sup>e</sup> jour) à 500 mg/kg/j durant 14 jours. Les testicules sont examinés macroscopiquement mais également par immunohistochimie afin d'apprécier l'index de maturation des cellules germinales. L'exposition *in utero* n'a pas de

conséquence notable sur les différents paramètres analysés à la naissance ou à l'âge adulte. Le taux de testostérone plasmatique est similaire entre exposés et témoins. L'analyse immunohistochimique met en évidence à la naissance chez les animaux traités des groupements inhabituels de cellules germinales chez les exposés, cellules germinales marquées principalement par OCT4, AP2 $\delta$  et c-KIT indiquant des gonocytes non différenciés. De telles agrégations cellulaires ont pu être retrouvées dans les tubes séminifères fœtaux de rats exposés au DBP. L'exposition des marmousets nouveau-nés au MBP se traduit par une réponse relativement hétérogène au niveau des cellules germinales. Enfin, les résultats des animaux exposés *in utero* ne mettent pas en évidence de changement à l'âge adulte. Les auteurs concluent à une absence d'effet de l'exposition au MBP *in utero* sur le développement et la fonction testiculaire. Les effets notés sur les cellules germinales n'apparaissent pas significatifs étant donné l'hétérogénéité des réponses (Inserm, 2011).

- Autres effets après une exposition *in utero*

Une autre étude a été réalisée chez le rat Sprague-Dawley exposé au DBP *in utero* par gavage de la mère du 12<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour de la gestation à 0 – 0,5 – 50 – 100 et 500 mg/kg/j (Mylchreest et al. 2000). Chez les nouveaux-nés mâles, de nombreuses lésions de l'appareil reproducteur mâle sont observées dans le groupe de dose le plus élevé. Dès 100 mg/kg/j, une absence de régression des mamelons est constatée. Cet effet apparaît comme un marqueur représentatif d'une altération de la différenciation sexuelle. Le NOAEL a été identifié à 50 mg/kg/j.

Dans une étude chez la souris exposée *via* l'alimentation aux doses de 0.005, 0.05 et 0.5% (soit 6.25, 62.5 et 625 mg/kg/j), du 1<sup>er</sup> au 18<sup>e</sup> jour de gestation, une diminution du nombre de naissances vivantes a été observée à la plus forte dose (Hamano et al., 1997). Des malformations sont également plus fréquentes dans les portées issues de ce groupe comparativement au groupe contrôle (spina bifida, exencéphalie...). A cette dose, une augmentation du poids des reins chez les mères a également été rapportée. Une NOAEL de 62.5 mg/kg/j basée sur les effets embryotoxiques et tératogènes peut être déduite de cette étude. A noter que seul un résumé de cette étude est disponible et que les doses calculées à partir des concentrations dans l'alimentation diffèrent entre le rapport Européen (RAR, 2003) et le rapport de Santé Canada (Canadian EPA, 1994).

En conclusion des études sur le développement, plusieurs études ont été réalisées chez la souris et le rat. Des effets embryotoxiques et tératogènes ont été observés. Les effets les plus sensibles sont observés sur le développement de l'appareil reproducteur mâle en lien avec une activité anti-androgénique du DBP. Les plus faibles doses associées à un effet ont été observées chez des rats. Un LOAEL de 2 mg/kg/j basé sur l'observation de la diminution spermatocytaire et des dysplasies mamelonnaires chez les nouveau-nés mâles ou femelles a été définie lors d'une exposition périnatale (Lee, 2004). Ces conditions d'exposition ne sont toutefois pas pertinentes pour l'élaboration d'une VLEP. Un NOAEL de 10 mg/kg/j basée sur une diminution de la concentration de testostérone testiculaire (observée à 50 mg/kg/j) peut être déduite après une exposition *in utero* (du 12<sup>ème</sup> au 19<sup>ème</sup> jour de gestation (Lehmann et al., 2004).

Récapitulatif des études sur la toxicité du DBP au cours du développement (NOAEL/LOAEL en mg/kg/jour)

**Tableau 21: Récapitulatif des études animales sur la toxicité du DBP au cours du développement (NOAEL/LOAEL en mg/kg/jour)**

Animal	Type d'étude (protocole)	VVoie	Durée ou période	animaux /groupe	NOAEL	LOAEL	Effet	Source
Souris JCL :ICR	Développement	orale	GD 1-GD 18					Hamano, 1977
Rat CD	Développement (NR)	orale	12 <sup>ème</sup> au 21 <sup>j</sup> de gestation	11 à 22	50 mg/kg/j	100 mg/kg/j	réduction de la distance anogénitale, rétention mamelonnaire, lésions testiculaires, malformation et diminution du poids des organes reproducteurs masculins	Mylchreest 1998, 1999 et 2000
Rat SD	Développement (NR)	orale	NR	NR	60 mg/kg/j	600 mg/kg/j	diminution de la distance anogénitale, retard de la séparation prépucciale, augmentation des troubles de la migration testiculaire et diminution du taux de testostérone sérique	McKee, 2004
Rat SD	Reproduction sur 2 générations (NR)	Orale continue de F0 à F1	indéterminé	NR	385 mg/kg/j	M 52 mg/kg/j F 80 mg/kg/j	Diminution du poids des mères F0 Poids des organes génitaux mâles, lésions dégénératives de l'épithélium germinal testiculaire, hyperplasie interstitielle, absence ou hypoplasie de l'épididyme des mâles F1 et F2	Wine, 1997
Rat	Développement (NR)	In utero et lactation	et 15 <sup>ème</sup> de gestation au 21 <sup>ème</sup> de lactation	8		2 mg/kg/j	réduction des spermatoocytes testiculaires, lésions dysplasiques mamelonnaires (dégénérescence vacuolaire chez le mâle, hypoplasie des bourgeons alvéolaires chez les femelles)	Lee, 2004
Rat SD	Développement (NR)	In utero et lactation	et NR	NR	50 mg/kg/j	250 mg/kg/j	atrophie testiculaire, absence de développement anormal de l'épididyme, nombre de spermatozoïdes réduit	Zhang, 2004
Rat SD castré	Activité anti androgénique (Hershberger)	Orale	10 jours	NR		20 mg/kg/j	Diminution du poids de la prostate ventrale	Lee, 2007
Rat SD	Développement post natal (NR)	Orale gavage (huile de maïs) à l'âge de 31 jours	14, 21 ou 28 jours	24 témoins ; 54 exposés	50 mg/kg/j	200 mg/kg/j	arrangement anormal des tubules séminifères et diminution des cellules spermatogènes	Long, 2008
Rat SD	Developpement foetal (NR)	In utero	12 <sup>ème</sup> au 19 <sup>ème</sup> jour de gestation		10 mg/kg/j	50 mg/kg/j	diminution du taux de testostérone testiculaire	Lehman, 2004
Rat Wistar	Developpement foetal (NR)	In utero	12 <sup>ème</sup> au 21 <sup>ème</sup> jour de gestation	4 à 16	20 mg/kg/j		agrégation anormale de cellules de Leydig, gonocytes multinucléés, baisse du taux de testostérone testiculaire	Mahood, 2007

## b) Cohérence Homme-animal et mécanisme d'action

Plusieurs études ont mis en relief une toxicité hépatique du DBP chez l'animal. Cependant le mécanisme d'action passerait par l'activation de récepteurs nucléaires (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, PPAR $\alpha$ ), or cette voie d'activation est minoritaire chez l'Homme et une extrapolation de l'animal à l'Homme ne peut donc être envisagée (CE, 2003).

Chez l'Homme, 3 études épidémiologiques portent sur les perturbations du développement *via* l'exposition maternelle au DBP (Swan, 2005 ; Marsee, 2006 ; Huang, 2008). Les résultats montrent clairement des effets sur les organes sexuels des nouveau-nés (garçon : réduction de la distance anogénitale, trouble de la migration testiculaire, hypoplasie scrotale et diminution de la taille de la verge ; filles : réduction de la distance anogénitale), identiques à ceux retrouvés dans les études expérimentales animales. De même, plusieurs études épidémiologiques montrent une relation entre une altération de la qualité spermatique et/ou une diminution des taux de

testostérone et l'exposition au DBP (Murature, 1987 ; Zhang, 2006 ; Pan, 2006 ; Hauser, 2006 ; Pant, 2008).

Chez l'animal, après une exposition de mâles à l'âge adulte, plusieurs types d'effets testiculaires, à la fois structuraux et fonctionnels sont observés, ainsi qu'une diminution de la fertilité mâle consécutive probablement à ces effets. Aucune étude mettant en évidence un lien entre une exposition au DBP à des femelles adultes non gestantes et des effets sur le système reproducteur n'a été identifiée. Dans les études sur une ou plusieurs générations, l'exposition des parents au DBP conduit à une diminution de la fertilité et à une embryotoxicité. Des effets identiques à ceux observés sur la première génération sont retrouvés sur la seconde génération mais à des doses plus faibles.

Concernant les effets observés chez l'animal après une exposition *in utero*, la grande majorité concerne le testicule fœtal et ont été observés lors d'études par gavage. Ces études rapportent des effets sur les trois principaux types cellulaires du testicule : cellules de Leydig, cellules de Sertoli et cellules germinales. De nombreux travaux signalent de manière cohérente : une agrégation des cellules de Leydig et la diminution de la production de testostérone et d'Insl3 (relaxin/insuline like 3) de ces cellules; une augmentation du diamètre des cordons testiculaires; l'apparition de gonocytes (cellules germinales fœtales) multinucléés (Inserm, 2011).

Il semble ainsi largement prouvé que le DBP administré aux rates gestantes inhibe l'activité stéroïdogène du testicule fœtal dans diverses souches de rats (Inserm, 2011). Si des fenêtres de susceptibilité au cours de la gestation ont pu être identifiées, il convient de souligner que la plupart des études ayant suivi la production de testostérone pendant la vie postnatale semble s'accorder sur le fait qu'à l'âge adulte, les taux plasmatique de testostérone des mâles exposés *in utero* sont comparables à ceux d'animaux non exposés (Inserm, 2011).

Les conséquences d'une inhibition de la synthèse de testostérone fœtale ont été clairement identifiées. Ainsi différents défauts de masculinisation sont décrits: une diminution de la distance anogénitale, la rétention d'aréoles mammaires ou de mamelons chez le mâle, la diminution de la longueur du pénis, une baisse du poids de la prostate, une augmentation des hypospadias et du taux de cryptorchidie. Une diminution de la distance anogénitale a été observée à des doses qui concordent généralement avec les effets observés sur la sécrétion de testostérone (de 250 à 750 mg/kg/j) chez le rat (Inserm, 2011).

Cependant, contrairement aux modèles rats, d'autres modèles animaux ont été assez peu étudiés. Si la métabolisation du DBP ne semble pas être différente chez le rat et la souris, il apparaît que chez la souris, les gènes impliqués dans le transport du cholestérol et la biosynthèse de la testostérone, ne sont pas affectés par une exposition *in utero* aux phtalates. La question de savoir si les effets observés chez le rat sont spécifiques de cette dernière espèce reste donc posée (Inserm, 2011).

On peut estimer qu'une bonne cohérence existe pour les effets reprotoxiques tant chez l'animal que chez l'Homme. Les effets reprotoxiques semblent donc les plus pertinents à considérer pour la réalisation d'une VLEP.

Ainsi, dans le cadre d'une évaluation des risques liés à une exposition au DBP, il paraît pertinent d'employer les données relatives à l'espèce la plus sensible, à savoir le rat mâle, durant la période qui paraît la plus sensible aux expositions, l'exposition *in utero*. Les effets sur le développement au niveau de l'appareil reproducteur mâle interviennent à la fois au niveau histologique et fonctionnel. Une énumération non exhaustive rapporte des lésions testiculaires (troubles de la migration, lésions dégénératives des tubes séminifères, diminution des spermatocytes, hyperplasie des cellules interstitielles, voire adénomes), des lésions de l'épididyme, des vésicules séminales, de la prostate, une diminution de la distance ano-génitale, l'augmentation du taux d'hypospadias, et enfin des persistances des mamelons. Le marqueur le plus sensible de ces effets semble être la mesure de la distance anogénitale. Ce paramètre est



facilement identifiable et mesurable chez l'homme comme chez l'animal. Il pourrait donc constituer un lien entre les études toxicologiques et les études épidémiologiques.

Les effets indésirables sur la fertilité sont une diminution des indices de fertilité, de la durée de gestation, du nombre de fœtus vivants par portée, du poids des nouveau-nés, mais aussi du poids de la mère, des lésions testiculaires des nouveau-nés, une puberté mâle retardée.

Conclusions :

Les conclusions de l'expertise Inserm (2011) ne conduisent pas à remettre en cause les données ayant servi à l'élaboration de valeurs de référence pour le DEHP, DBP et le BBP par l'Anses.

## Annexe 9 : Grille d'analyse des études épidémiologiques sur les effets des phtalates sur le système reproducteur masculin.

**Titre de l'article:** New Zealand Malayan war veterans' exposure to dibutylphtalate is associated with an increase incidence of cryptorchidism, hypospadias and breast cancer in their children.

**Auteurs:** Carran M, Shaw IC The New Zealand Medical Journal 2012; 125, 1358:52-63.

Etude de cohorte retrospective portant sur l'incidence des hypospadias, cryptorchidies, cancers du sein chez les enfants de vétérans ayant servis en Malaisie de 1948 à 1960, et exposés au DBP (acaricide) appliqué quotidiennement sur leurs vêtements (prévention du typhus, avec une comparaison de la dose théorique calculée (64mg/kg/jour) chez ces vétérans et du LOAEL relevé dans la littérature (50 mg/kg/jour - rat).

**Conclusion :** De nombreuses limites et biais (nombre de sujets inclus très faible, recrutement régional, taux de réponses de faible, biais de mémorisation sélective ; données d'exposition approximatives et basées uniquement sur des hypothèses en cascades ; Comparaison du LOAEL théorique humain et LOAEL chez le rat) ne permettent pas de retenir cette étude.

**Titre de l'article:** Anogenital distance and the risk of prostate cancer. Castano-Vinyals G, Auteurs: Carrasco E, Lorente JA, Sabate Y, Cirac-Claveras J, Pollan M, Kogevinas M BJUI 201 ; 110 :E707-E710.

**Conclusion :** Pas de lien avec phtalates

**Titre de l'article:** Increased incidence of infertility treatment among women working in the plastics industry.

**Auteurs:** Hougard KS, Hannerz H, Feveile H, Bonde JP. Reproductive Toxicology 2009; 27: 186-189.

Etude de cohorte historique étudiant la relation entre infécondité et le fait d'avoir travaillé dans les industries « plastifiantes ».

Méthodologie adéquate sauf pour le classement des personnes exposées dans les industries du « plastiques » uniquement lié à la notification des individus via leurs dossiers médicaux (via le Danish Industrial Classification of All Economics Activities ; 1993) – aucune donnée sur poste de travail et le niveau réel d'exposition.

Très faible nombre de cas d'infécondités masculines - Pas d'ajustement sur tabac, contraception, obésité et mode de vie - RR à la limite de la signification chez les femmes et non significatif chez les hommes.

**Conclusion :** Très faible niveau de preuve et résultats non significatifs pour les hommes.

**Titre de l'article:** Joensen U. N., et al. Phtalate excretion pattern and testicular function: a study of 881 healthy Danish men. Environmental Health Perspectives, 2012.

Etude « fortement » exposés versus « peu » exposés, réalisée au sein d'une cohorte historique, avec analyse de taux hormonaux et de paramètres spermatiques en fonction des niveaux (fort versus faible) d'exposition aux métabolites des phtalates.

Les résultats montrent un niveau détectable (> 95%) des métabolites des phtalates, avec une différence très significative de la SHBG, pour le MEHP (entre le quartile le plus élevé et le plus faible), différence significative pour la FSH, ainsi que pour le FAI et le FAI/LH ces (résultats toutefois essentiellement dus à la SHBG). Aucune différence significative (après ajustement) pour les différents paramètres spermatiques – en pratique seul le volume spermatique montre un p égal à 0.01.

**Conclusion :** une bonne étude de référence ne montrant pas d'altération majeure et significative des hormones reproductives, ni des paramètres spermatiques, en fonction du niveau d'exposition aux phtalates (du moins, au métabolite MEHP) ; seule la SEGB semble impliquée mais il semble difficile, à ce niveau, de proposer un mécanisme physiopathologique se rapportant uniquement à la SEGB.

**Titre de l'article :**

**Auteurs: Mendioal et al., Urinary concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites and serum reproductive hormones: pooled analysis of fertile and infertile men. J Androl. 2012 May-Jun;33(3):488-98.**

Etude prospective (cohorte « Study for Future Families ; couple dont la femme est enceinte (sans PMA) recruté lors des consultations prénatales entre 1999 et 2005 - questionnaire et 1 prélèvement urinaire et sanguin).

Dosages de MEHP, MEHHP, MEOHP, MECPP, MCP, MEP, MBzP, MCNP, MCOP, MiBP, MBP – FSH, LH, SHBG, testostérone, FAI (testostérone totale/SHBG x 100) - Testostérone libre (à partir de la testostérone totale, albumine, et SHBG via l'équation de Vermeulen) - Relation entre hormones reproductives et somme des métabolites du DEHP.

Conclusion : Etude retenue (malgré les imites inhérentes à un prélèvement urinaire unique) montrant l'absence globale d'effet des métabolites des phtalates sur les hormones reproductives, excepté une possible et faible association, sur la testostérone libre et plus spécifiquement sur la SHBG.

### **Titre de l'article**

**Auteurs: Suzuki Y, J Yoshinaga, Y Mizumoto, S Serizawa, and H Shiraishi, 2012, Foetal Exposure to Phthalate Esters and Anogenital Distance in Male Newborns, International Journal of Andrology, 35: 236-244.**

Etude prospective menée dans le centre hospitalier des Forces de Défenses de Tokyo, auprès de 344 femmes enceintes recrutées via leur gynécologue et ayant accepté de donner un échantillon d'urines et de faire examiner leur enfant à la naissance.

Un prélèvement urinaire effectué entre la 9<sup>ème</sup> et la 40<sup>ème</sup> semaine ; Dosages de MMP, MEP, MnBP, MBzP, MEHP, MEHHP, MEOHP – dosages des isoflavones urinaires / à la naissance, mesures de diverses distances anogénitales.

Conclusion, étude non retenue (dosage urinaire unique – pas d'information sur les expositions professionnelles antérieures ou au moment du prélèvement urinaire. - faible nombre de personnes incluses - biais majeur lié à la fiabilité de la mesure de la distance anogénitale eu égard à la multiplicité des évaluateurs).

## Annexe 10 : Données relatives au diisononyl phthalate (DINP) – Effet d'une exposition fœtale et/ou néonatale sur le développement des fonctions de reproduction mâle

**Boberg et al. (2011) Reproductive and behavioral effects of diisonylphthalate (DINP) in perinatally exposed rats. *Reprod toxicol* 31:200-209.**

Etude effectuée à l'Institut de sécurité Alimentaire à Søborg (Danemark)

Financement public danois et européen.

DiNP (CAS#28553-12-0)

### Protocole.

Gavage quotidien, de rates Sprague-Dawley gestantes de GD 7 (6,5 jpc?) à PND 17 (16 jpp ?) avec le solvant, 300, 600, 750 ou 900 mg/kg/jour de DiNP.

Sacrifice et/ou observation

- à GD 21 (20,5 jpc)= avant-dernier jour de la vie intrautérine : histologie du testicule fœtal et analyse de sa fonction stéroïdogène.
- à 1PND = 1<sup>er</sup> jour de la vie extrautérine : mesure AGD.
- à PND 13 (12jpp?): poids corporel et observation des mamelons.
- à partir de PND 21 (sevrage) analyse de la séparation du prépuce-gland du pénis.
- à PND 22 : prélèvement sanguin (dosage de l'inhibine B).
- à PND 90 : sacrifice, pesée de différents organes, histologie du testicule, dosage des hormones intratesticulaires, analyse du sperme épидидymaire.

### Résultats :

1) toxicité générale / maternelle :

Poids corporel de la mère, nombre de fœtus par portée, nombre d'avortés par portée et sex-ratio inchangés.

Poids des nouveau-nés inchangés.

Poids à PND 13 diminué avec DINP 900.

2) Reprotoxicité pendant le développement

#### Histologie du testicule fœtal (GD21):

Apparition de gonocytes multinucléés (MNG) avec DINP 600, 750 et 900 mg/kg/j. Mais 2 fœtus sur 8 provenant de 2 portées différentes sont affectés dès DINP 300 (control : 0 affecté).

Non migration des gonocytes à la périphérie des cordons séminifères avec DINP 750 et 900 mg/kg/j.

Augmentation du diamètre des cordons séminifères avec DINP 750 et 900 mg/kg/j.

#### Activité stéroïdogène du testicule fœtal (GD21)

Testostérone intratesticulaire réduite avec DINP 600 mg/kg/j.

Tendance à la réduction de la testostéronémie et à une augmentation de la LH dans le plasma mais non significative (n=3 à 4 seulement).

### Effet endocrine du testicule

At PND1 et à PND13, la DAG rapportée au poids du nouveau-né réduite avec DINP 900 mg/kg/j. Avec les doses plus faibles, il existe une tendance à la réduction de la DAG mais elle n'est pas statistique

A PND13, il y a une non-disparition des mamelons avec DINP 750 et 900 mg/kg/j Cet effet est à la limite de la signification statistique avec DINP 600 mg/kg/j ( $p=0.058$ ).

A PND22 pas de modification des concentrations plasmatiques d'inhibine B.

### 3) Reprotoxicité observée chez l'adulte (PND 90)

#### Observations

- 1) Pas de maintien des mamelons sauf chez 6 mâles sur 115 pour les fortes doses,
- 2) Pas de réduction de l'AGD,

3) Pas de modification du poids du foie, de la thyroïde, des reins, des testicules, de la prostate, de l'épididyme, des vésicules séminales, des muscles releveurs de l'anus et bulbo-caverneux.

#### Histologie

Pas de modification histologique significative des testicules de la prostate et des vésicules séminales. Cependant 1 animal a une histologie testiculaire altérée dans les groupes 750 mg/kg/j et 900 mg/kg/j.

#### Endocrino

Inhibine et testo normales

#### Analyses spermatiques

- 1) Pas de modification du nombre et de la vitesse de mobilité des spermatozoïdes épидидymaires
- 2) Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est réduit avec DINP 600 mg/kg/j, 750 mg/kg/j et 900 mg/kg/j.

### 3) Conclusion

#### Fin de vie fœtale

NOAEL : 300 mg/kg/jour ; LOAEL= 600mg/kg/jour

#### Nouveau-né (PND 1)

NOAEL : 750 mg/kg/jour ; LOAEL= 900mg/kg/jour

#### Prépubère (PND 13)

NOAEL : 600 mg/kg/jour ; LOAEL= 750mg/kg/jour

#### Adulte (PND 13)

NOAEL : 300 mg/kg/jour ; LOAEL= 600mg/kg/jour

**Résumé : DINP : NOAEL : 300 mg/kg/j et LOAEL 600 mg/kg/j.**

### Discussion

#### 1) Comparaison avec les autres phtalates

1) Le DINP a les mêmes types d'effet sur le développement des fonctions de reproduction masculine que le DBP et le DEHP : histologie du testicule fœtal (gonocytes plurinucléés, un accroissement du diamètre des tubes séminifères), réduction de la DAG, réduction de la stéroïdogénèse testiculaire, non-disparition des mamelons.

2) Les NOAEL/LOAEL du DEHP et du DBP sont plus faibles :

- Exemple 1 : avec un gavage par le DEHP depuis 7,5 jpc à 16,5 jpc (cad une période d'exposition moins longue pendant la période critique de masculinisation qui s'étend de 14,5 à 18,5 jpc), la distance ano-génitale mesurée à 1jpp est réduite dès **10 mg/kg/j** Il en est de même de la rétention des mamelons observée à 12 jpp et du poids du muscle releveur du pénis (Christiansen *et al* 2010 *Reprod toxicol* 30 :313-321).

- Exemple 2 : avec un protocole comparable (addition de DEHP à la nourriture de 15 jpc à 21 jpc) et observation à 2 jpp, la distance ano-génitale est réduite dès 20 ppm (**1,5-3 mg/kg/j**) (Lee *et al* 2004 *Toxicology* 203 :221-238).

- Exemple 3 : avec un protocole comparable (gavage avec DBP de 12,5 jpc à 21,5 jpc et sacrifice à 21 jpc) le volume du testicule est réduit dès **50 mg/kg/j**, et le nombre de gonocytes multinuclés est augmenté dès 100 mg/kg/j (Boekelheide *et al* 2009 *Microsc Res Tech* 72 :629-638).

- Exemple 4 : avec un protocole moins prolongé (gavage avec du DBP de GD 12 à GD 21, la DAG est réduite avec 500 mg/kg/j à 1jpp et la rétention des mamelons est observée avec **100 mg/kg/j** à 13 jpp (Barlow *et al.* 2004. *Toxicol pathol* 32 :79-90).

- Exemple 5 : gavage 0, 100, 250 et 500 mg/kg/j de DBP de 12,5 jpc à 21,5 jpc. Observation de la DAG à PND1 (NOAEL =100 et LOAEL = 250), de la rétention des mamelons à PND14 (NOAEL =50 et LOAEL = **100 mg/kg/j** ) et d'un retard dans la séparation du prépuce et du gland étudiés entre PND38 et PND45 (NOAEL = 50, LOAEL = **100 mg/kg/j**), (Mylchreest *et al* 1999; *Toxicol Applied Pharmacol* 1256 : 81-95 ; Foster *et al* 2001 *Human reprod update* 7: 231 235).

- Exemple 6 : gavage 0, 20, 100 et 500 mg/kg/j de DBP de 13,5 jpc à 20,5 jpc. Mesure de la testostérone intratesticulaire, de l'aggrégation des cellules de Leydig et des gonocytes multinuclés à 21,5 jpc. Pour les 3 endpoints : NOAEL =10 et LOAEL = **100 mg/kg/j** mais tendance à l'observation d'un effet dès **20 mg/kg/j**), (Mahood *et al* 2007; *Environ Health Perspect* 115 (suppl.) : 55-61)

**Donc LOAEL DEHP = 3 à 10 mg/kg/j et LOAEL DBP = 20 à 50 mg/kg/j.**

3) Les effets observés ici sont comparables à ceux observés avec l'autre isomère du DINP (le DINP 1, CAS#68515-48-0) par Gray *et al* (2000).

2) Comparaison avec les autres études sur le DINP

Est en accord ou proche avec les études précédentes :

- Gray *et al* 2000, *Toxicol Sci* 58 : 350-365. Le pourcentage de malformations congénitales (hypospadias, cryptorchidism, petits testicules,...) est de 82 à 84 % après gavage de 14 jpc à 3 jpp par 750 mg/kg/j de DEHP ou de BBP et de seulement 7% pour le DiNP (CAS # 68515-48-0).

- Clewel *et al.*2013 : après absorption alimentaire de DiNP de 12 jpc à 14jpp:

\* à 2jpp des gonocytes multinuclés à partir de 250 mg/kg/j,

\* à 14 jpp pas d'apparition des mamelons même avec 1500 mg/kg/j mais réduction de l'AGD avec 1500 mais pas avec 500 mg/kg/j.

\* adulte : pas d'effet sur de nombreux paramètres. LOAEL de l'effet critique (poids des muscles releveur de l'anus et bulbo-caverneux) : 750 (foetal) puis 1500 (nouveau né).

### 3) Pertinence des études

1) les études qui analysent les effets antiandrogéniques des phtalates sur le testicule foetal de rat, ne peuvent pas donner des résultats directement extrapolables à l'espèce humaine. En effet, il a été montré que le MEHP ne modifie pas la production de testostérone par le testicule foetal humain en culture organotypique (Lambrot et al 2009, Environ Health Perspect. 2009 117:32-7). Cet absence d'effet des phtalates sur la stéroïdogénèse a été confirmé chez des testicules foetaux humains greffés chez des rat ou des souris immunodéprimés (Mitchell et al 2012 JCEM 97(3):E341-8 ; Heger et al 2012, Environ Health Perspect. 2012 120:1137-43). Notons également que l'effet antiandrogénique des phtalates n'a pas été retrouvé dans de nombreuses études chez la Souris (Lehraiki et al 2009, Toxicol Sci 111 :372-82, Gaido et al Toxicol Sci 97(3):E341-8., Heger et al 2012, Environ Health Perspect. 2012 120:1137-43).

2) L'effet des phtalates sur la formation de gonocytes multinucléés est un end-point qui a bien une meilleure pertinence dans l'extrapolation à l'espèce humaine. Cet effet a été décrit in vivo et in vitro chez le Rat et la Souris (Lehraiki et al 2009, Toxicol Sci 111 :372-82, Gaido et al Toxicol Sci 97(3):E341-8, Lehman et al Toxicol Sci 81(1):60-68) L'induction par le DBP de gonocytes multinucléés a été observée récemment dans des xenogreffes de testicules foetaux humains après gavage par le DBP dès la plus faible dose utilisée (100 mg/kg/j) (Heger et al 2012, Environ Health Perspect. 2012 120:1137-43). Notons néanmoins que cette augmentation n'avait pas été observée dans le testicule foetal humain en culture (Lambrot et al 2009, Environ Health Perspect. 2009 117:32-7). Dans les 3 espèces (rat, souris, homme) les phtalates augmentent l'apoptose des gonocytes mais ce paramètre n'est pas étudié dans cet article.

### Conclusions :

Etude bien faite sans biais méthodologique.

**DINP : NOAEL : 300 mg/kg/j et LOAEL 600 mg/kg/j.**

Cependant l'extrapolation des données concernant l'effet antiandrogène du phtalate pour l'ERS du DiNP serait critiquable, cet end-point n'étant pas sensible aux phtalates dans l'espèce humaine.

### **Clewell RA et al. (2013) Disposition of DiNP and its effects on sexual development of the male fetus following repeated dosing in pregnant rats.**

*Reprod. Toxicol.* 35:56-69.

Etude effectuée au Research Triangle Park en Caroline du Nord.

Etude financée par ExxonMobil Biomedical Science

DiNP (CAS#68515-48-0)

### Protocole :

Gavage quotidien, de rates Sprague-Dawley gestantes de 12,5 à 19,5 jpc avec 1ml/kg de DiNP à 50, 250 ou 750 mg/mL. (valeurs mesurées : 47, 242 et 760 mgDiNP/mL).

Sacrifice à 19,5 jpc :

- 1) Dosage des métabolites
- 2) Histologie du testicule foetal et analyse de sa fonction stéroïdogène

### Résultats :

#### 1) toxicité générale / maternelle :

- Poids du foie maternel augmenté pour 250 mg/kg/j et 750 mg/kg/j.
- Poids corporels de la mère et du foetus, poids du foie foetal inchangés.

#### 2) Métabolisme

- Demi-vie des différents métabolites : 4 à 7h dans plasma maternel et 4 à 15h chez le fœtus.
- Le métabolite le plus représenté est le MCIOP et sa demi-vie est deux fois supérieure dans le compartiment fœtal que dans le compartiment maternel.
- Les concentrations des métabolites sont 1,2 à 3 fois inférieures dans le plasma fœtal par rapport au plasma maternel.
- Les concentrations dans le testicule fœtal sont similaires à celles du plasma fœtal.

### 3) Reprotoxicité

#### Histologie du testicule foetal:

Apparition de gonocytes multinuclés à partir de 250 mg/kg/j

Analyse du nombre de gonocytes non rigoureuse donc sans intérêt

Nombre d'agrégats de cellules de Leydig augmenté avec 750 mg/kg/j (présence chez 7 animaux/8 vs 2/25 chez les témoins). Pas d'effet observé avec 250 mg/kg/jour (présence chez 1 animal/8).

#### Activité stéroïdogène du testicule foetal

Distance ano-génitale non affectée quelque soit la dose.

Testostérone intratesticulaire 2h après le gavage diminuée avec 250 et 750 mg/kg/j mais pas avec 50 mg/kg/j.

Testostérone intratesticulaire 24h après le gavage non affectée quelque soit la dose.

### 4) Conclusion

NOAEL du DINP: 50 mg/kg/j

LOAEL du DINP: 250 mg /kg/j

## Discussion

### Comparaison avec études antérieures

Est en accord avec les études précédentes :

Gray et al 2000, Toxicol Sci 58 : 350-365. Le pourcentage de malformations congénitales (hypospadias, cryptorchidism, petits testicules,...) est de 82 à 84 % après gavage de 14 jpc à 3 jpp par 750 mg/kg/j de DEHP ou de BBP et de seulement 7% pour le DiNP (CAS # 68515-48-0).

Boberg et al 2011 Reprod Toxicol 31:200-209. NOAEL du DiNP (CAS No 28553-12-0)= 300mg/kg/j pour l'effet antiandrogénique et reprotoxique (gavage 7 à 21 dpc et observation à 21 jpc).

### 2) Comparaison avec les autres phtalates

Le DINP est moins toxique que le BBP, le DBP et le DEHP :

- Un gavage avec 750 mg/kg/j de ces 3 derniers provoque non seulement une réduction de la production de testostérone et l'apparition de gonocytes plurinuclés mais aussi une réduction de la distance ano-génitale et un accroissement du diamètre des tubes séminifères.

- Les LOAEL du DBP et du DEHP sont plus faibles :

- *Exemple 1* : avec un protocole comparable (gavage de 12 jpc à 21 jpc et sacrifice à 21jpc) le volume du testicule est réduit dès 50mg/kg/j, et le nombre de gonocyte multinuclés est augmenté dès 100 mg/kg/j (Boekelheide *et al.* 2009 Microsc Res Tech 72 :629-638).

- *Exemple 2* : avec un protocole comparable (gavage de 7 jpc à 16 jpc et sacrifice à 1jpp) la distance ano-génitale est réduite dès 10 mg/kg/j de DEHP (Christiansen *et al.* 2010 Reprod toxicol 30 :313-21).



- *Exemple 3* : avec un protocole comparable (addition à la nourriture de 15 jpc à 21 jpc) et observation à 2 jpp, la distance ano-génitale est réduite dès 20 ppm (1,5-3 mg/kg/j) de DEHP (Lee *et al.* 2004 Toxicology 203 :221-238).

- En se référant à la concentration intratesticulaire de métabolite, le MiNP est 4 ou 7 fois moins actif que le MBP ou le MEHP pour inhiber la production de testostérone.

### 3) pertinence de l'étude

- Toutes les études qui analysent les effets antiandrogéniques des phtalates sur le testicule foetal de rat, ne peuvent pas donner des résultats directement extrapolables à l'espèce humaine. En effet, il a été montré que le MEHP ne modifie pas la production de testostérone par le testicule foetal humain en culture organotypique (Lambrot *et al.* 2009, Environ Health Perspect. 2009 117:32-7). Cette absence d'effet des phtalates sur la stéroïdogénèse a été confirmée chez des testicules foetaux humains greffés chez des rat ou des souris immunodéprimés (Mitchell *et al.* 2012 JCEM ; Heger *et al.* 2012, Environ Health Perspect. 2009 120:1137-43).

- L'effet des phtalates sur la formation de gonocytes multinucléés est un end-point qui a bien une meilleure pertinence dans l'extrapolation à l'espèce humaine. Cet effet a été décrit *in vivo* et *in vitro* chez le Rat et la Souris (Lehraiki *et al.* 2009, Toxicol Sci 111 :372-82, Gaido *et al.* Toxicol Sci 97(3):E341-8, Lehman *et al.* Toxicol Sci 81(1):60-68) L'induction par le DBP de gonocytes multinucléés a été observée récemment dans des xenogreffes de testicules foetaux humains après gavage par le DBP dès la plus faible dose utilisée (100 mg/kg/j) (Heger *et al.* 2012, Environ Health Perspect. 2012 120:1137-43). Notons néanmoins que cette augmentation n'avait pas été observée dans le testicule foetal humain en culture (Lambrot *et al.* 2009, Environ Health Perspect. 2009 117:32-7). Dans les 3 espèces (rat, souris, homme) les phtalates augmentent l'apoptose des gonocytes mais ce paramètre n'est pas étudié dans cet article.

### Conclusion

Etude bien faite sans biais méthodologique.

NOAEL du DINP: 50 mg/kg/j, LOAEL du DINP: 250 mg/kg/j.

Cependant l'extrapolation des données concernant l'effet antiandrogénique du phtalate pour l'ERS du DiNP serait critiquable, cet end-point n'étant pas sensible aux phtalates dans l'espèce humaine.

**Clewell RA *et al.* (2013) A dose response study to assess effects after dietary administration of diisononyl phthalate (DINP) in gestation and lactation on male rat sexual development - *Reprod toxicol* 35:70-80.**

Etude effectuée au Research Triangle Park en Caroline du Nord.

Etude financée par ExxonMobil Biomedical Science

DiNP (CAS#68515-48-0)

Protocole :

Le DINP et le DBP est ajouté à la nourriture de rates Sprague-Dawley gestantes de 12,5 jpc à 14 jpp.

Le DINP est ajouté aux concentrations de 0, 760 ppm (= 50 mg/kg/j espéré), 3800 ppm (= 250 mg/kg/j espéré), 11400 ppm (= 750 mg/kg/j espéré). Le DBP est ajouté à la concentration de 7600 ppm (= 500 mg/kg/j espéré) dans un groupe pour constituer le groupe témoin positif. En fait

la consommation de phtalates réelle mesurée a été égale à la consommation espérée de 13,5 à 21,5 jpc mais elle a été le double de la consommation espérée de 2 à 14 jpp.

A 2, 14 et 49/50 jpp : pesée de tous les mâles et observation de leur distance ano-génitale et des mamelons

Sacrifice à 2 jpp (un mâle par portée) et à 49/50 jpp (tous les mâles)

- anatomie de l'appareil génital mâle et histologie des testicules et des vésicules séminales
- dosage de la testostérone intratesticulaire

Résultats :

1) toxicité générale / maternelle :

- Toxicité générale maternelle

Le poids corporel de la mère est diminué par l'absorption alimentaire de 11400 ppm de DiNP à 20 jpc et à 2 et 14 jpp.

Les autres traitements ne modifient pas le poids corporel de la mère.

- Toxicité générale sur la descendance

Pas d'effet sur le poids corporel de 760 ppm DiNP de 2 jpp à 50 jpp.

Avec 3800 ppm DiNP le poids corporel est diminué à 14 jpp mais cette diminution est compensée à 50jpp.

Avec 11400 ppm DiNP le poids corporel est diminué à 2 et à 14 jpp mais cette diminution n'est plus statistiquement significative à 50 jpp.

Pas d'effet sur le poids corporel de 7600 ppm DBP de 2 à 50 jpp.

## 2) Métabolisme

Dans le plasma du nouveau né (2jpp) on trouve 30 à 100 fois plus de MCiOP que de MiNP, MHiNP, MOiNP.

Pour une même absorption de DBP ou de DiNP, les concentrations de MBP et de MiNP dans le plasma sont 10 à 1000 fois plus fortes chez le fœtus que chez le nouveaux-nés de 2 jours. Par exemple :

avec 50 mg/kg/j de DiNP, la concentration plasmatique de MiNP est de 20 µM chez le fœtus et de 0,02 µM chez le nouveau-né.

avec avec 50 mg/kg/j DBP, la concentration de MBP plasmatique est de 45 µM chez le fœtus et 3µM chez le nouveau né.

Ceci peut résulter d'un transfert via le lait beaucoup moins efficace que le transfert placentaire.

## 3) Reprotoxicité

Observations à 2 jpp:

1) Le poids du testicule n'est affecté par aucun traitement par le DiNP alors qu'il est réduit par le traitement avec le DBP.

2) On observe une augmentation significative du nombre d'animaux présentant des gonocytes multinuclés à partir de 3800 ppm DiNP (augmentation également avec 7600 ppm DiNP).

Remarque : On note une tendance à l'augmentation pour 760 ppm DiNP mais elle n'est pas significative (2 animaux positifs/20 versus un seul animal /24 chez les « controls »). Cela aurait mérité une analyse plus précise comme par exemple une quantification du nombre de gonocytes multinuclés par testicule plutôt que la quantification de la proportion d'animaux présentant des gonocytes multinuclés sur une coupe choisie au hasard.

3) L'analyse du nombre de gonocytes n'est pas rigoureuse. Elle est donc sans intérêt.

4) Le nombre d'agrégats de cellules de Leydig est augmenté par 11400 ppm DiNP (présence chez 19 animaux/19 vs 4/20 chez les témoins).

Remarque : avec 3800 ppm DiNP on n'observe pas d'effet statistiquement significatif malgré un doublement de la fréquence d'observation des agrégats (8 animaux/20 vs 4/24 chez les « controls »). Là aussi, ce point aurait mérité une analyse morphométrique quantitative de ce paramètre dans le testicule néonatal plutôt qu'une simple évaluation de la proportion d'animaux présentant ou non des agrégats sur une coupe choisie au hasard. Ceci aurait été d'autant plus nécessaire que l'agrégation des cellules de Leydig est un phénomène normal observé au cours du développement du testicule néonatal chez le rat et ce n'est pas un phénomène pathologique.

5) La distance ano-génitale n'est affectée par aucun traitement par le DiNP alors qu'elle est réduite par le traitement avec le DBP. Notons que les auteurs annoncent qu'ils ont dosé la testostérone intratesticulaire à 2 jpp dans le paragraphe matériel et méthodes, mais ils ne présentent aucun résultat.

#### Observation à 14 jpp:

1) Aucun traitement avec le DiNP n'induit de rétention des mamelons alors que le DBP a cet effet.

2) La distance ano-génitale est réduite avec 11400 ppm de DiNP et 7600 ppm de DBP.

#### Observation à 49-50 jpp:

1) Aucun traitement (DiNP et DBP) ne modifie

le poids du testicule et de l'épididyme, du gland du pénis et des glandes de Cowper.

la concentration de testostérone intratesticulaire

2) Alors que le DBP induit une rétention des mamelons, aucun traitement avec le DiNP n'a cet effet.

3) Alors que le DBP induit

- une diminution du poids des vésicules séminales, de la prostate ventrale mais aussi du rein

- des malformations épидидymaires

- une augmentation de la fréquence d'apparition de testicules hypertrophies,

aucun traitement avec le DiNP n'a ces effets.

4) Le DiNP (11400 ppm) et le DBP (7600 ppm) induisent une diminution du poids des muscles releveurs de l'anus et bulbo-caverneux.

#### **4) Conclusion**

Observation

- à 2jpp NOAEL : 760 ppm (50 mg/kg/j) et LOAEL : 3800 ppm (250 mg/kg/j)

- à 14 jpp NOAEL : 3800 ppm (500 mg/kg/j) et LOAEL : 11400 ppm (750 mg/kg/j théorique mais en fait 750 mg/kg/j pendant la vie foetale et 1500 mg/kg/j pendant la vie néonatale et prépubère)

- chez l'adulte : NOAEL : 3800 ppm et LOAEL : 11400 ppm.

Résumé : DiNP : NOAEL : 50 mg/kg/j et LOAEL 250 mg/kg/j.

Discussion

1) Conclusion des auteurs

L'exposition fœtale et pendant l'allaitement à 11400 ppm DiNP a des conséquences antiandrogéniques qui disparaissent pratiquement toutes chez l'adulte contrairement à celles observées avec 7600 ppm de DBP. On pourrait donc dire que le NOAEL global du DiNP est de 11400 ppm (750 mg/kg/j)

## 2) Comparaison avec les études antérieures

Est en accord avec les études précédentes :

- Gray et al 2000, Toxicol Sci 58 : 350-365. Le pourcentage de malformations congénitales (hypospadias, cryptorchidisme, petits testicules,...) est de 82 à 84 % après gavage de 14 jpc à 3 jpp par 750 mg/kg/j de DEHP ou de BBP et de seulement 7% pour le DiNP.
- Boberg et al 2011 Reprod Toxicol 31:200-209. NOAEL du DiNP (CAS No 28553-12-0)= 300mg/kg/j pour l'effet antiandrogénique et reprotoxique (gavage 7 à 21 dpc et observation à 21 jpc).

Est en désaccord avec Boberg et al 2011 et Gray et al 2000 qui rapportent un développement des mamelons permanent chez l'adulte à 750 mg/kg/j de DiNP.

## 3) Pertinence de l'étude

Concernant l'effet sur les cellules de Leydig et ses conséquences (effet antiandrogénique des phtalates) :

- le modèle rat, a une pertinence limitée en santé publique. En effet, il a été montré que le MEHP ne modifie pas la production de testostérone par le testicule fœtal humain en culture organotypique (Lambrot et al 2009, Environ Health Perspect. 2009 117:32-7). Cet absence d'effet a été confirmé chez des testicules fœtaux humains greffés chez des rat ou des souris immunodéprimés (Mitchell et al 2012 JCEM ; Heger et al 2012).

-les cellules de Leydig fœtales régressent vers 15 jours après la naissance chez le rat et les progéniteurs des cellules de Leydig de type adulte ne se différencient qu'à partir de 12 jours postpartum. Ainsi dans le protocole utilisé ici seuls les précurseurs des cellules de Leydig du testicule prépubère, pubère et adulte ont été exposés aux phtalates.

Concernant l'effet sur la lignée germinale:

L'effet des phtalates sur la formation de gonocytes multinucléés est un end-point a bien une meilleure pertinence dans l'extrapolation à l'espèce humaine. Cet effet a été décrit in vivo et in vitro chez le Rat et la Souris (Lehraiki et al 2009, Toxicol Sci 111 :372-82, Gaido et al Toxicol Sci 97(3):E341-8, Lehman et al Toxicol Sci 81(1):60-68) L'induction par le DBP de gonocytes multinucléés a été observée récemment dans des xenogreffes de testicules foetaux humains après gavage par le DBP dès la plus faible dose utilisée (100 mg/kg/j) (Heger et al 2012, Environ Health Perspect. 2012 120:1137-43). Notons néanmoins que cette augmentation n'avait pas été observée dans le testicule fœtal humain en culture (Lambrot et al 2009, Environ Health Perspect. 2009 117:32-7). Dans les 3 espèces (rat, souris, homme) les phtalates augmentent l'apoptose des gonocytes mais ce paramètre n'est pas étudié dans cet article.

Conclusion

Etude bien faite sans biais méthodologique.

**DiNP : NOAEL : 50 mg/kg/j et LOAEL 250 mg/kg/j.**

Cependant des études morphométriques auraient permis de conforter (ou d'invalider) les NOAEL de cette étude.

Enfin, l'extrapolation des effets antiandrogéniques de cette étude à l'espèce humaine doit être prudente.

**Adamsson *et al.* (2009) Effect of maternal exposure to di-isononylphthalate (DINP) and 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (p,p'-DDE) on steroidogenesis in fetal rat testis and adrenal gland. *Reprod toxicol* 28:66-74.**

Travail effectué dans le laboratoire dirigé par Toppari à l'Université de Turku (Finlande)

Etude financée par des fonds publics et associatifs

DiNP (N° CAS non précisé)

Protocole : Gavage quotidien, de rates Sprague-Dawley gestantes de 12,5 à 17,5 jpc avec 1ml/kg de DiNP à 250 ou 750 mg/mL.

Sacrifice à 19,5 jpc :

- microscopie électronique du testicule foetal. '
- dosage immunofluorométrique de la testostérone intratesticulaire
- Q RT-PCR et Western blot.

Résultats :

1) toxicité générale / maternelle :

- Poids des fœtus mâles augmenté pour 250 mais pas pour 750 mg/kg/j.
- Poids des fœtus femelles inchangé.

2) Reprotoxicité

Microscopie électronique du testicule foetal:

- Pas de modifications de l'aspect histologique et ultrastructural des testicules fœtaux après traitement par 250 ou 750 mg/kg/j.

Cellules de Leydig fœtales

- Le contenu testiculaire en testostérone n'est pas modifié à 19,5 jpc (48h après le dernier gavage).
- Niveau des mRNA de *StAR*, *3β-HSD*, *SF-1* et concentrations protéique en *StAR* et *3β-HSD* non modifiés quelque soit la dose.
- La concentration des mRNA de *P450scc* est augmentée avec 750 mg/kg/j mais pas avec 250 mg/kg/j. En revanche l'expression protéique de *P450scc* n'est pas modifiée quelque soit la dose.
- La concentration de mRNA de *l'Ins/3* est augmentée avec 750 mg/kg/j mais pas avec 250 mg/kg/j.

Cellules de Sertoli

- Le niveau des mRNA de *GATA-4* est augmenté avec 750 mg/kg/j mais pas avec 250 mg/kg/j.

4) Conclusion

NOAEL du DINP: 250 mg/kg/j

LOAEL du DINP: 750 mg/kg/j

5) Discussion

Interprétations

- 1) Pas d'effet négatif du traitement 48h après l'arrêt du traitement par le DiNP. Cependant, on peut penser que le traitement a eu un effet négatif sur l'activité du testicule foetal (voir article 1 :

Clewell *et al.* 2013). Donc on peut déduire qu'au moins à court terme, l'effet du DiNP est réversible.

2) L'effet positif du DiNP observé ici peut résulter d'un « rebond ». Il y aurait un effet négatif du traitement qui se manifesterait pendant le traitement et quelques heures après le dernier gavage à 17,5 jpc. Cet effet négatif induirait, via les boucles de rétrocontrôle, une augmentation de la sécrétion de LH ou d'autres hormones. Cette augmentation hypercompenserait la chute initiale 48h après le dernier gavage.

b) Comparaison avec les autres phtalates

Cette étude doit être comparée à l'étude de l'effet du DBP faite par l'équipe de Gaido (Thompson *et al.* (2004) *Endocrinology* 145 :1227-37). Dans cette étude les rates gestantes ont été gavées pendant la même période de (12.5 à 17.5 jpc) par 500 mg/kg/j de DBP. A 17,5 jpc, la production testiculaire de testostérone et les niveaux des mRNA de *StAR*, *P450scc*, *P450-17alpha* sont diminués. Ces effets sont encore présents (et même accentués) à 18,5 jpc, c'est-à-dire 24h après l'arrêt du traitement. A 19,5 jpc (48h après l'arrêt du traitement comme dans protocole d'Adanson *et al.*) la production de testostérone montre une tendance au retour à la normale et les niveaux des mRNA de *StAR*, *P450scc*, *P450-17alpha* sont totalement revenus à la normale. Il n'y a cependant pas le petit rebond positif observé ici par Adanson *et al.* Probablement parce que l'effet du DBP est plus important que celui du DINP et ce rebond se produira plus tard.

c) pertinence de l'étude

Toutes les études qui analysent les effets antiandrogéniques des phtalates sur le testicule foetal de rat, ne peuvent pas donner des résultats directement extrapolables à l'espèce humaine. En effet, il a été montré que le MEHP ne modifie pas la production de testostérone par le testicule foetal humain en culture organotypique (Lambrot *et al.* 2009, *Environ Health Perspect.* 2009 117:32-7). Cet absence d'effet des phtalates sur la stéroïdogénèse a été confirmé chez des testicules foetaux humains greffés chez des rat ou des souris immunodéprimés (Mitchell *et al.* 2012 *JCEM* ; Heger *et al.* 2012, *Environ Health Perspect.* 2009 120:1137-43).

6) Conclusion

Etude bien faite sans biais méthodologique réalisée par une des meilleures équipes mondiales de la discipline.

**NOAEL du DINP: 250 mg/kg/j, LOAEL du DINP: 750 mg/kg/j**

Cependant le protocole choisi est peu propice à la détection des effets du traitement puisque le délai entre l'arrêt du traitement et l'observation (48h) est anormalement trop long.

Enfin, aucun des « endpoints » choisis dans cette étude n'est sensible aux phtalates dans l'espèce humaine. L'extrapolation des résultats de cette étude à l'espèce humaine peut donc souffrir de biais importants.

**Borch *et al.* (2004) Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal prepubertal and adult male rats - *Reprod Toxicol* 18:53-61.**

Travail effectué dans le laboratoire dirigé par Vinggard à l'Institut de sécurité Alimentaire à Søborg (Danemark)

Etude financée par le ministère de l'Agriculture et de la Pêche.

DiNP (N° CAS 28553-12-0) et DEHP N° CAS : 117-81-7

Protocole : Gavage quotidien, de rates (souche ?) gestantes de 6,5 jpc à 20,5 jpc avec DiNP 750 mg/kg/j, DEHP 300mg/kg/j, DINP750+DEHP300, ou solvant.

Sacrifice à 20,5 jpc: activité stéroïdogène du testicule

Résultats :

1) Reprotoxicité

A 20,5 jpc :

la réduction de la production testiculaire de testostérone est de même importance après traitement par DINP 750 mg/kg/j et DEHP 300 mg/kg/j.

Effet cumulatif de DINP750 mg/kg/j et de DEHP 300 mg/kg/j.

2) Conclusion

- DINP a un pouvoir antiandrogène plus faible que le DEHP.

**Effet DINP 750mg/kg/j = effet DEHP 300 mg/kg/j.**

**Gray LE et al (2000). Perinatal exposure to phthalates DEHP, BBP and DiNP, but not DEP, DMP or DOTP alters sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci* 58:350-365.**

Etude effectuée au Research Triangle Park en Caroline du Nord.

Financement de l'étude non précisé.

DEHP (CAS#117-81-7)

BBP (Benzyl-butyl-phthalate) (CAS#85-68-7)

DINP (Di-iso-Nonyl-phthalate) (CAS#68515-48-0)

DEP (Di-Ethyl-phthalate) (CAS#84-66-2)

DMP (Di-Methyl-phthalate) (CAS#131-11-3)

DOTP ou DEHT (Diocetyl terephthalate ou Di-ethyl-hexyl-terephthalate (CAS#6422-86-2).

Protocole

Des rates Sprague-Dawley âgées de 90 jours sont mis en accouplement et gavées de 750 mg/kg/j d'un phthalate (ou de solvant) de GD 12 (= 11 ,5 jpc) à PND 3 (=2 jpp).

A 1 jpp: pesée de tous les mâles et observation de leur distance ano-génitale.

A 12 jpp observation des mamelons.

A 28 jpp sevrage puis suivi de la puberté (séparation prépucciale).

Adulte (5 mois) : sacrifice et analyse morphologique, histologique et hormonale.

Résultats :

1) Reprotoxicité à 2 jpp

Le poids du testicule n'est réduit que par BBP et DEHP

La distance ano-génitale n'est affectée que par BBP et DEHP

Altérations histologiques du testicule avec gonocytes multinuclés avec BBP et DEHP

2) Reprotoxicité à 12 jpp

1) Maintien des mamelons avec BBP (70%), DEHP (87%) et aussi avec DiNP (22%) bien que l'effet soit quantitativement plus faible avec ce dernier.

3) Reprotoxicité à 28-110 jpp

1) Jamais de retard à la puberté (séparation prépucciale)

2) Malformations de l'appareil reproducteur (testis, épидидyme, prostate... dans 84% pour BBP, 82% pour DEHP, 8% pour DiNP et 0% pour lrs autres.

4) Conclusion

Si on établit un Phthalate Ester Toxic Equivalence Factor (PE-TEF) on obtient

DEHP-TEF= 1

BBP-TEF = 1

DBP-TEF = 0,5 (basé sur l'étude précédente de ce groupe)

DINP-TEF = 0,05 à 0,1

DEP-TEF =0

DMP-TEF = 0

DEHT-TEF = 0

Discussion / conclusion

- 1) Etude historique de comparaison des effets antiandrogènes et reprotoxiques de différents phtalates conduite avec un grand nombre d'animaux et par une équipe pionnière et reconnue.
- 2) Certains end points choisis dans cette étude ne sont pas sensibles aux phtalates dans l'espèce humaine.

**Hannas BR, Lambright CS, Furr J, Howdeshell KL, Wilson VS, Gray LE Jr., 2011. Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisoheptyl phthalate, and diisononyl phthalate. Toxicol Sci. 2011 Sep;123(1):206-16**

L'équipe de Hannas a aussi regardé les effets du DINP (Hannas et al., 2011). Pour le DINP, les doses utilisées n'étaient pas les mêmes et étaient plus élevées, 0, 500, 750, 1000, 1500 mg/kg/j. Les effets observés étaient les mêmes que pour les deux autres phtalates mais de manière moins importante que ce soit pour la testostéronémie fœtale ou pour l'expression des gènes Star et Cyp11a.



## Annexe 11 : Données relatives au diisobutylphthalate (DIBP)

**Saillenfait *et al.* (2006) Developmental toxic effects of diisobutyl phthalate, the methyl branched analogue of di-n-butyl phthalate administered by gavage to rats –Toxicol letter 18:53-61.**

Travail effectué dans le laboratoire dirigé par Anne Marie Saillenfait à INRS de Vanoeuvre  
Etude financée par l'INRS.

DIBP (N° CAS 84-69-5).

### Protocole :

Gavage quotidien, de rates Sprague Dawley gestantes de 6,5 jpc à 20,5 jpc, par le DIBP (0, 250, 500, 750, 1000 mg/kg/j).

Sacrifice à 21,5 jpc.

### Résultats :

Embryotoxicité

- Réduction du poids de l'utérus gravide pour DIBP 500, 750, 1000
- Nombre de site d'implantation inchangé
- Nombre de fœtus par portée réduit pour DIBP 750 et 1000
- Sex ratio des fœtus inchangé
- Poids fœtal (mâle ou femelle) réduit pour DIBP 500, 750, 1000

Effets tératogènes

- malformations viscérales (anophtalmie, défauts aortiques, hernie du diaphragme, agénésie ou hypodéveloppement rénal pour DIBP 750 et 1000.
- malformations squeletiques (retard de l'ossification des vertèbres, côtes surnuméraires) pour DIBP 750 et 1000.

Reprotoxicité

Retard dans la migration transabdominale des testicules dans les groupes 500 et 750 mg/kg/j.

Remarque : la descente transabdominale des testicules dépend de la production par les cellules de Leydig foetales d'Insl3 et non pas de testostérone. D'où une difficulté de comparaison avec les autres articles qui étudient des effets antiandrogéniques.

### Conclusions

1) **DIBP : NOAEL= 250 mg/kg/j, LOAEL = 500 mg/kg/j.**

2) Comparaison avec le DBP :

Mylchreest *et al* (2000) Toxicol Sci 55 : 143-155. Les auteurs utilisent un protocole comparable (gavage par le DBP de 12,5 jpc à 21,5 jpc). Ils déterminent

- un NOAEL de 100 mg/kg/j et un LOAEL de 500 mg/kg/j pour la réduction de la DAG à 0 jpp,
- un NOAEL de 50 mg/kg/j et un LOAEL de 100 mg/kg/j pour la rétention des mamelons à 13 jpp.

**Hannas BR, Lambright CS, Furr J, Howdeshell KL, Wilson VS, Gray LE Jr., 2011. Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisoheptyl phthalate, and diisononyl phthalate. Toxicol Sci. 2011 Sep;123(1):206-16**

L'équipe de Hannas (2011) a exposé par voie orale des rattes gestantes (SD) à 0, 100, 300, 600 ou 900 mg/kg/j pendant la période de gestation soit entre jpc 14 et 18. Les petits mâles ont été analysés à jpc 18. Ainsi, une diminution significative de la production de testostérone fœtale a pu être observée (300mg/kg/j) ainsi qu'une diminution significative de l'expression de deux gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, StAR et CYP11a1 (300mg/kg/j et 100mg/kg/j, respectivement).

**Saillenfait et al., 2006. Diisobutyl phthalate impairs the androgen-dependent reproductive development of the male rat***Toxicol Lett.* 2006 Aug 1;165(1):39-46. **Saillenfait et coll. (2008)** a aussi regardé les effets du DIBP au cours de la gestation (jpc 12-21) chez des rattes gestantes (SD) à des doses similaires (0, 125, 250, 500, ou 625 mg/kg/j ; par gavage). Les rats mâles ont été observés à différents temps, J21 (prépubère), J76-86 (jeune adulte) et J111-122. Aucun effet n'a été mis en évidence sur les paramètres de gestation. Le poids des mâles était diminué significativement à J1 et J21 uniquement pour la dose 625 mg/kg/j. La distance anogénitale était aussi diminuée significativement dès la dose 250 mg/kg/j. Une augmentation du nombre de malformations (cryptorchidie, hypospadias) était mise en évidence ainsi qu'une diminution, à l'âge adulte, du poids des testicules, épидидymes, vésicules séminales et prostate. Un retard pubertaire significatif a aussi été observé dès 500 mg.kg/j.

## Annexe 12 : Données relatives au di-n-heptylphthalate (DHPP) et au di-n-octylphthalate (DnOP)

Saillenfait *et al.* 2011 Prenatal development toxicity studies on di-n-heptyl and di-n-octyl phthalates in Sprague-Dawley rats *Reprod toxicol* 32:268-276.

Travail effectué dans le laboratoire dirigé par Anne Marie Saillenfait à INRS de Vanoeuvre.

Etude financée par l'INRS.

### Protocole :

Des rates Sprague-Dawley de Charles Rivers sont acclimatées à l'animalerie de l'INRS pendant 1 à 2 semaines puis sont mises en accouplement et gavées par 0, 250, 500, 1000 mg/kg/j de DHPP ou de DnOP de 6,5 à 20,5 jpc.

Sacrifice à 21,5 jpc.

### Résultats :

#### 1) Toxicité générale

Le poids corporel de la mère, le nombre de descendants vivants ne sont pas modifiés.

#### 2) Métabolisme

- 1) Augmentation des transaminases hépatiques avec 1000 mg/kg/j DHPP et 500 mg/kg/j DnOP.
- 2) Augmentation du poids du foie avec 1000 mg/kg/j DHPP ou DnOP.

#### 3) Reproduction et développement

- 1) Pas de modification du nombre de foetus, du nombre d'avortés, du poids foetal.
- 2) La DAG est réduite chez les mâles avec 1000 mg/kg/j de DHPP mais n'est jamais réduite avec le DnOP.
- 3) Nombre de phalanges proximales réduit avec 500 DHPP et 1000 DnOP.
- 4) Présence d'une côte lombaire surnuméraire dès 250 mg/kg/j de DHPP ou de DnOP.

#### 4) Conclusion

NOAEL : non déterminé.

LOAEL : 250 mg/kg/j pour les 2 phtalates étudiés.

### Discussion

Critère le plus sensible : malformation foetale.

Un effet sur les fonctions de reproduction (réduction de la DAG) ne s'observe qu'avec 1000 mg/kg/j de DHPP et jamais avec le DnOP. Il y a donc peu d'effet reprotoxique mais les critères sensibles chez le rat (dosage de testostérone intratesticulaire, gonocytes multinucléés n'ont pas été évalués).

Alors que le DHPP et le DIHP d'une part, et le DnOP et le DHEP d'autre part ont la même formule brute, leur toxicité est très différente. Il y a donc une grande influence de la structure du phtalate (ramification de la chaîne carbonée) sur son activité biologique.

Est en accord avec les études précédentes sur la souris:  
(profil toxicologique du DnOP fait par l'ATSDR)

### **Conclusion**

1) LOAEL = 250 mg/kg/j

2) Etude bien faite sans biais méthodologique mais

- cette étude est essentiellement morphologique et aurait été plus sensible avec des analyses histologiques et fonctionnelles.
- cette étude s'arrête à la fin de la vie foetale sans suivi postnatal.

## Annexe 13 : Données relatives au diisooctyl phthalate (DIOP)

Saillenfait et al (2013), ont étudié le DIOP en réalisant trois protocoles : 1/des femelles gestantes (SD) ont été exposées à 0, 0,1, 0,5, 1 g/kg/j de DIOP par gavage entre jpc 6 et 20 avec un temps d'observation à jpc 21. Une augmentation des pertes post implantatoires et des points de résorption a pu être observée pour la dose maximale ainsi qu'une diminution du poids des fœtus à 0,5 et 1 g/kg/j et l'existence de testicules non descendus à 1 g/kg/j. Un retard d'ossification a aussi été noté à 0,5 et 1 g/kg/j; 2/ des rattes gestantes ont été exposées au DIOP à différentes doses 0, 0,01, 0,1, 0,5, 1 g/kg/j de jpc 12 à 19 avec un temps d'observation à jpc 19. Une diminution significative de la production ex vivo de la testostérone fœtal a pu être observée dès 0,1 g/kg/j; 3/la dernière exposition a permis d'exposer toujours des rattes gestantes de jpc12 à 21 à différentes doses de DIOP (0, 0,1, 0,5, 1 g/kg/j) avec des temps d'observation après la naissance en prépubertaire (j21-22), en postpubertaire (j 68-71) et à l'âge adulte (j 82-84). Des anomalies du système reproductif mâle comme l'hypospadias, les testicules non descendus, la diminution des poids bruts et relatifs des testicules et des épидидymes ainsi que des anomalies histologiques avec une "hypospermatogenèse" ont pu être observés pour le groupe 1g/kg/j.

## Annexe 14 : Données relatives au dipentylphthalate (DnPeP) – Effet d'une exposition fœtale et/ou néonatale sur le développement des fonctions de reproduction masculine

L'équipe de Hannas et al (2011) Dipentyl Phthalate dosing during sexual differentiation disrupts fetal testis function and postnatal development of the male Sprague-Dawley rat with greater relative potency than other phthalates - *Toxicol Sci* 120:184-193.

Etude effectuée au Research Triangle Park à l'Environmental Protection Agency (EPA) en Caroline du Nord.

Financement public par les Agences Sanitaires.

### Protocole :

Gavage quotidien, de rates Sprague-Dawley gestantes de 14,5 à 18,5 jpc ou de 8,5 à 18,5 jpc avec DPeP à 0, 11, 33, 100, 300 mg/kg/j. (valeurs déterminées par une expérience préliminaire qui a évalué la production de testostérone par le testicule fœtal 5 h après l'administration d'une dose unique de DPeP).

- 1) Etude de l'activité androgène du testicule fœtal à 18,5 jpc.
- 2) Etude de la masculinisation à la naissance et chez le prépubère.

### Résultats :

#### 1) toxicité générale / maternelle :

- Poids corporels de la mère et des nouveau-nés, inchangés
- forte augmentation de la mortalité fœtale/néonatale évaluée par le nombre de nouveau-nés vivants par rapport au nombre de site d'implantation utérins. Dans le protocole gavage de 8,5 à 18,5 on a NOAEL=33 mg/kg/j, LOAEL= 100 mg/kg/j, ED 50 = 294 mg/kg/j. Avec 100 mg/kg/j la taille des portées est réduite de moitié.

#### 3) Reprotoxicité

##### Effet foetal (gavage GD 14-18)

A GD 18, réduction dose-dépendante de la production testiculaire de testostérone NOAEL = 11 mg/kg/j ; LOAEL = 33 mg/kg/j et ED50 = 48 mg/kg/j.

A GD 18, réduction dose-dépendante de l'expression testiculaire :

- de StAR (NOAEL = 33 mg/kg/j ; LOAEL = 100 mg/kg/j et ED50 = 46 mg/kg/j).
- de Cyp11a (NOAEL = 100 mg/kg/j ; LOAEL = 300 mg/kg/j et ED50 = 143 mg/kg/j).
- de Insl3 (NOAEL = 33 mg/kg/j ; LOAEL = 100 mg/kg/j et ED50 = 87 mg/kg/j).

##### Effet néonatal et prépubert

réduction de la DAG à PND2 : après gavage GD 14-18 : NOAEL = 33 mg/kg/j ; LOAEL = 100 mg/kg/j et ED50 = 257 mg/kg/j (après gavage 8-18: NOAEL = 100 mg/kg/j ; LOAEL = 300 mg/kg/j et ED50 = 253 mg/kg/j).

non-disparition des mamelons à PND 13 : après gavage GD 14-18 NOAEL = 100 mg/kg/j ; LOAEL = 300 mg/kg/j et ED50 = 175 mg/kg/j.

#### 4) Conclusion

NOAEL du DPeP: 11 mg/kg/j.

LOAEL du DPeP: 33 mg/kg/j.

ED 50 du DPeP : 46 mg/kg/j.

## Discussion

**1) Comparaison de la sensibilité des différents end-points** Les ED 50 se classent ainsi:

Production de testostérone < ou = expression de StAR < expression d'insl3 < expression de cyp11a < rétention des mamelons < réduction de la DAG.

## 2) Comparaison avec les autres phtalates

L'effet anti androgène du DPeP est 2 à 9 fois plus important que celui du DEHP étudié précédemment par la même équipe (E Gray) dans les mêmes conditions expérimentales (Howdeshell et al 2008 (Toxicol Sci 105 : 153-165).

- réduction de la production de testostérone NOAEL du DEHP = 100 (vs 11 pour DPeB), ED50 du DEHP = 388 (vs 47 pour DPeB),

- réduction de la DAG: NOAEL du DEHP = 300 (vs 33 pour DPeB), ED50 du DEHP = 521 (vs 257 pour DPeB),

- rétention des mamelons: NOAEL du DEHP= 300 (vs 100 pour DPeB), ED50 du DEHP= 785 (vs 175 pour DPeB).

## 3) Pertinence de l'étude

- L'étude analyse les effets antiandrogéniques des phtalates sur le testicule foetal de rat. Or cet effet n'a pas été retrouvé dans l'espèce humaine. L'extrapolation des résultats de cette étude à l'espèce humaine doit se faire avec prudence.

## Conclusions

Etude bien faite sans biais méthodologique.

**NOAEL du DPeP: 11 mg/kg/j, LOAEL du DPeP: 33 mg/kg/j ; ED 50 du DPeP: 46 mg/kg/j.**

Le DPeP est 2 à 9 fois plus efficace pour réduire l'activité androgène du testicule foetal que ne l'est le DEHP.

Cependant l'extrapolation directe des données concernant l'effet antiandrogéniques du phtalate pour l'ERS du DPeP serait criticable, cet end-point n'étant pas sensible aux phtalates dans l'espèce humaine.

## Annexe 15 : Données relatives au di-n-hexyl phthalate (DnHP)

### Saillenfait et al., 2013. J Appl Toxicol. 2013 Jun 11. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone production in fetal rat testis after exposure to di-n-hexyl phthalate

Une étude menée par Saillenfait et coll. (2013), après une exposition de rattes gestantes (SD) par voie orale à différentes doses de DnHP (5 à 625 mg/kg/j) pendant la période de gestation (jpc 12-19), a montré une diminution significative de la testostérone fœtale dès 20 mg/kg/j; une diminution significative de l'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogenèse : SR-B1 (dès 20 mg/kg/j), StAR, P450ssc, P450C17 (dès 50 mg/kg/j) et 3 $\beta$ HSD (dès 100 mg/kg/j) ainsi que des modifications histologiques touchant principalement les cellules de Leydig (diminution, agrégat.). Un NOAEL de 5 mg/kg/j est proposé par les auteurs.

### Aydođan Ahabab M, Barlas N. Food Chem Toxicol. 2013 Jan;51:123-36. Developmental effects of prenatal di-n-hexyl phthalate and dicyclohexyl phthalate exposure on reproductive tract of male rats: Postnatal outcomes

Une autre équipe a étudié le même phthalate en exposant par gavage des rattes gestantes Wistar (jpc 6-19), à différentes doses proches de l'étude réalisée par Saillenfait et coll. (0, 20, 100 ou 500 mg/kg/jour) et en observant les rats mâles à différents temps soit en période prépubertaire, pubertaire et adulte (Ahabab et al., 2013). Les résultats de ce travail montrent une diminution significative des poids relatifs des testicules (dès 100mg/kg/j en prépubertaire et pubertaire, et dès 20mg/kg/j chez l'adulte), une diminution significative des poids relatifs des vésicules séminales et des épидидymes uniquement au temps d'observation pubertaire (dès 500 mg/kg/j et 100mg/kg/j, respectivement). Les dosages hormonaux étaient aussi significativement modifiés avec une diminution de la testostéronémie dès 20 mg/kg/j, uniquement pour la période pubertaire.

Sur le plan histologique, des modifications étaient aussi observées : augmentation d'atrophie des tubules avec présence de vacuolisation. Les réserves spermatiques n'étaient pas modifiées, seul le nombre d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes était augmenté.



## Annexe 16 : Données relatives au diisoheptyl phtalate (DIHP)

**Hannas BR, Lambright CS, Furr J, Howdeshell KL, Wilson VS, Gray LE Jr., 2011. Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisoheptyl phthalate, and diisononyl phthalate. Toxicol Sci. 2011 Sep;123(1):206-16**

De la même manière que pour le DIBP, Hannas et son équipe a étudié les effets du DIHP en utilisant les doses suivantes 0, 100, 300, 600 et 900 mg/kg/j. L'exposition a été réalisée entre jpc 14 et 18 et les petits mâles ont été analysés à 18 jpc. Les auteurs montrent que l'hCG augmente de manière significative la production de testostérone du testicule fœtal dans chaque groupe d'environ 2,3 fois ce qui indique que la réponse des cellules de Leydig à un stimulus « LH-like » n'était pas compromise par le DIHP (Hannas et al., 2011).

## Annexe 17 : Données relatives au diundecyl et le ditridecyl phthalates (DUDP/DTDP)

**Saillenfait *et al.*, 2013. Reproductive Toxicology 37 (2013) 49– 55 Prenatal developmental toxicity studies on diundecyl and ditridecyl phthalates in Sprague-Dawley rats.**

Dans l'étude de Saillenfait et coll. (2013), des rattes gestantes (SD) ont été exposées entre jpc 6 et 20 par voie orale soit au DUDP soit au DTDP à différentes doses 0, 0,25, 0,5, ou 1 g/kg/j. Les animaux ont été observés à jpc 21.

Aucun effet n'a été observé chez les femelles gestantes pour les 2 phthalates. La distance anogénitale n'a pas été modifiée. Le nombre de testicules non descendus n'était pas augmenté dans les groupes exposés.

## Annexe 18 : Données relatives au di-n-propyl phthalate (DnPP)

### Saillenfait *et al.*, 2011. J Appl Toxicol. 2011 Jan;31(1):36-44. Developmental toxic potential of di-n-propyl phthalate administered orally to rats

Selon le même protocole d'exposition décrit ci-dessus, l'équipe de Saillenfait a testé le DnPP à différentes doses (0; 0,5; 1 et 1,5 g/kg/j) (Saillenfait *et al.*, 2011).

Une diminution significative du poids des rats mâles a été observée pour la dose 1,5g/kg/j ainsi qu'une diminution de la distance anogénitale à partir de 1g/kg/j. Il n'y avait pas d'effet sur la descente testiculaire.

## Annexe 19 : Données relatives au diallylphthalate (DAP)

**Saillenfait AM, Gallissot F, Sabaté JP. Food Chem Toxicol. 2008 Jun; 46(6):2150-6. Evaluation of the developmental toxicity of diallyl phthalate administered orally to rats.**

L'équipe de Saillenfait, toujours avec le même protocole a testé le DAP (0, 100, 150, 200 et 250 mg/kg/j).

Il n'y avait pas d'effets sur le nombre de sites d'implantation, de pertes post implantatoires, de fœtus vivants. Le poids de l'utérus gravide était diminué de manière significative pour la dose 250 mg/kg/j ainsi que le poids des fœtus (200 mg/kg/j et 250 mg/kg/j) mâle. Un retard d'ossification (250 mg/kg/j) et des anomalies du squelette (200 mg/kg/j et 250 mg/kg/j) ont aussi été observés.

**Annexe 20 : Grille d'analyse de l'étude de Carran M, Shaw IC The New Zealand Medical Journal 2012;125, 1358:52-63. New Zealand Malayan war veterans' exposure to dibutylphthalate is associated with an increase incidence of cryptorchidism, hypospadias and breast cancer in their children.**

Type d'étude	<b>Cohorte rétrospective</b>
Objectif de l'étude	<p><b>Incidence</b> des hypospadias, cryptorchidies, cancers du sein chez les enfants de vétérans ayant servis en Malaisie de 1948 à 1960, et exposés au DBP (acaricide) appliqué quotidiennement sur leurs vêtements (prévention du typhus)</p> <p><b>Modélisation</b> chez ces vétérans de l'absorption cutanée (via les données de la littérature) du DBP (dibutylphthalate) via leurs vêtements, avec calcul théorique de la dose quotidienne absorbée (en mg/kg /jour)</p> <p><b>Comparaison</b> de la dose théorique calculée (64mg/kg/jour) chez ces vétérans et du LOAEL relevé dans la littérature (50 mg/kg/jour - rat)</p>
Financement de l'étude	Université de Canterbury, NZ
Description du protocole	<p><b>Validation</b> par des interviews auprès d'un échantillon de ces vétérans portant sur leurs capacités à se souvenir d'avoir eu, 50 ans après les faits, des applications quotidiennes de DBP</p> <p><b>Utilisation de questionnaires postaux</b> auprès de 252 soldats ayant servi dans les services d'urgence en Malaisie de 1948 à 1960 (via des données statistiques militaires) et résidant au moment de l'étude dans la province de Canterbury</p> <p><b>Questionnaire portant sur :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- vérification de leurs états de soldats,</li> <li>- vérification de leurs expositions quotidiennes au DBP,</li> <li>- leur descendance (naissances d'enfants ou de petits-enfants au cours de leur séjour en Malaisie et à leur retour ainsi que de la survenue chez ceux-ci d'hypospadias, de cryptorchidies, de cancer du sein, de puberté précoce, de faible numération des spz, d'infécondité, de désordres ovariens ou utérins)</li> </ul> <p>/ entretien téléphonique en cas de réponses peu claires // en cas de réponses positives au dernier item « pathologies », prise de contact et vérification directe auprès de la personne concernée</p> <p><b>Reconstitution des vêtements utilisés lors de la guerre en Malaisie</b> – application de 1mL de DBP (correspondant à la dose reçue par les soldats) et mise en contact avec des vêtements en coton similaires à ceux utilisés par ces soldats – <b>calcul de l'absorption de DBP dans les tissus par spectrophotométrie</b></p>
Exposition	DBP (acaricide - prévention du typhus) appliqué quotidiennement sur les vêtements
Séquence dans le temps	<b>1948 – 1960, soit 12 années</b>
Facteurs de confusion (âge, sexe, tabac, etc.)	<p>Pas de prise en compte de l'alimentation (phytoestrogènes par voie alimentaire), du stress</p> <p>Exposition possible au DBP au retour de Malaisie non documentée</p>

Analyse statistique et critère de qualité associé	Comparaison des taux d'incidence retrouvés chez ces vétérans à ceux observés dans la population générale (utilisation des données nord-américaines pour le cancer du sein)
Principaux résultats /force de l'association observée	<p><b>N=252</b></p> <p>85/252 ont retournés le questionnaire (34%) 13 exclusions (non exposés)</p> <p><b>N' = 71 (inclusion réelle)</b></p> <p><b><u>Pathologies dans la descendance</u></b></p> <p>58/71 ont eu, après leur retour en Nouvelle Zélande, 155 enfants, 79 garçons et 76 filles</p> <p><u>Cryptorchidie</u> : 5.1% (4 cas) (chez les exposés versus 1.1% en population générale - (p&lt;0.05)</p> <p><u>Hypospadias</u> : 2.5% (2 cas) chez les exposés versus 0.3% en population générale - (p&lt;0.05)</p> <p><u>Cancer du sein</u> : 4.0% (3 cas) chez les exposés versus 0.48% en population générale - (p&lt;0.05)</p> <p>NS pour les autres pathologies</p> <p><b><u>Absorption du DBP via les vêtements</u></b></p> <p>Taux d'application du DBP calculé de 23mL pour les pantalons et de 7mL pour les chemises ; en prenant un taux d'absorption minimale de 0.22g/ml, la dose minimale d'exposition cutanée serait de 6.6g et, pour une absorption cutanée estimée à 68%, l'absorption réelle serait alors de 4.5g.</p> <p>Considérant le poids moyen de ces soldats égal à 70kg, la dose quotidienne absorbée par ces vétérans est alors estimée à 4.5g/70kg = <b>64mg/Kg/jour</b>.</p>
Conclusions des auteurs	<p><b><i>Epigénétique pouvant expliquer la survenue des pathologies observées dans la descendance (hypospadias, cryptorchidies, cancer du sein)</i></b></p> <p><b><i>Similitude entre la dose « calculée » quotidienne absorbée chez ces vétérans de 64mg/Kg/jour et la LOAEL de 50mg/kg/jour observée chez le rat</i></b></p> <p><b><i>Effet biologique suspecté du DBP sur la reproduction masculine</i></b></p>
Qualité de l'étude	<p><u>Points forts</u> :</p> <p>Étude de cohorte Bonne étendue de la durée de suivi Utilisation d'indicateurs d'exposition quantitatifs Utilisation de données de registre</p> <p><u>Points faibles</u> :</p> <p><b>Nombre de sujets inclus très faibles (252) – recrutement régional</b> <b>Taux de réponses de seulement 34%</b> <b>Biais majeur possible de mémorisation sélective</b> : seuls les vétérans ayant eu une descendance avec ces pathologies pourraient avoir répondu au questionnaire</p>

	<p>(de plus, biais de mémorisation générale lié à l'âge élevé et biais d'information pour les personnes décédées)</p> <p>Pas d'information sur durée d'inclusion de la période post-retour en Nouvelle Zélande</p> <p>Nombre de cas de ces pathologies très faibles (&lt;5) mais étonnamment élevé par rapport à la littérature internationale lorsque ces nombres sont rapportés en taux d'incidence (par exemple, incidence observée de cryptorchidie de 5%, incidence observée de cancer du sein de 4%)</p> <p>Pas de précisions sur la survenue de ces pathologies sur les enfants versus les petits-enfants</p> <p><b>Données d'exposition approximatives et basées uniquement sur des hypothèses en cascades</b></p> <p>Pas d'information sur les expositions postérieures au retour en Nouvelle Zélande</p> <p>Comparaison du LOAEL théorique humain et LOAEL chez le rat</p> <p><b>Conclusion : faible niveau de preuve</b></p>
--	---

**Annexe 21 : Grille d'analyse de l'étude de Hougard KS, Hannerz H, Feveile H, Bonde JP. Increased incidence of infertility treatment among women working in the plastics industry. Reproductive Toxicology 2009; 27: 186-189.**

Type d'étude	Cohorte historique / patients inféconds/ recrutement hospitalier de 1995 à 2005
Objectif de l'étude	Relation infécondité et travailler dans les industries « plastifiantes »
Financement de l'étude	Institutionnel
Description des groupes d'exposition (exposé, non exposé, en fonction des niveaux d'exposition)	<p>Exposé = avoir travaillé de manière régulière dans une entreprise de fabrication de plastiques, indication obtenu lors de l'admission à l'hôpital via la notification de profession (utilisation du Danish Industrial Classification of All Economics Activities ; 1993)</p> <p>Non-exposé = ne pas avoir travaillé dans une entreprise de fabrication de plastiques</p> <p>Couples inféconds (infécondité &gt; une année) Hommes de 20 à 59 ans (sans précision) Femmes de 20 à 39 ans (toutes causes)</p>
Paramètres de santé	Inclusion via traitement pour infécondité (homme et/ou femme)
Exposition	Danish Industrial Classification of All Economics Activities ; 1993
Analyse statistique et critère de qualité associé	Standardisation sur CSP, âge, revenu
Principaux résultats /force de l'association observée	<p>Travailleurs « suivis » dans la plasturgie : 27 445 personnes années pour les femmes 93665 personnes années pour les hommes</p> <p>107 cas d'infécondités féminines retrouvées chez les « femmes exposées aux plastifiants » pour un nombre attendu de 87, soit un RR (risque relatif RR) de 1.23 (1.01-1.48).</p> <p>41 cas d'infécondités masculines retrouvées chez les « hommes exposés aux plastifiants » pour un chiffre attendu de 50, soit un RR de 0.82 (0.59-1.11).</p>



Conclusions des auteurs	<p>Suspicion de relation chez les femmes - Possibilité de mélange d'expositions chez les travailleurs</p> <p>Aucune relation trouvée chez les hommes</p> <p>Arguments pour poursuivre les recherches sur le sujet</p>
Qualité de l'étude	<p>Points forts Bonne étude de cohorte – recrutement sur 11 années – bonne équipe de recherche</p> <p>Points faibles Classement des personnes exposés dans « plastiques » très insuffisante et uniquement lié à la notification des individus dans leurs dossiers médicaux (via le Danish Industrial Classification of All Economics Activities ; 1993) – aucune donnée sur poste de travail et le niveau réel d'exposition</p> <p>Très faible nombre de cas d'infécondités masculines limitant d'autant l'observation d'effets possibles Pas d'ajustement sur tabac, contraception, obésité et mode de vie RR à la limite de la signification chez les femmes RR non significatif chez les hommes</p> <p>Conclusion : TRES FAIBLE niveau de preuve</p>

**Annexe 22 : Grille d'analyse de l'étude de Joensen U. N., et al.  
Phtalate excretion pattern and testicular function: a study of 881  
healthy Danish men. Environmental Health Perspectives, 2012.**

Type d'étude : Etude « fortement » exposés versus « peu » exposés, réalisée au sein d'une cohorte historique.

Objectif : analyse de taux hormonaux et de paramètres spermatiques en fonction des niveaux (fort versus faible) d'exposition aux métabolites des phtalates,

Publication : bonne revue (Environmental Health Perspectives)

Financement : Commission européenne, Agences danoises, Hôpitaux et Universités du Danemark, Fondation privée

Descriptif des groupes : Constitution à partir d'un échantillon représentatif de 881 hommes danois jeunes (moyenne = 19.5 +/-1.3), de sous-groupes classés selon le niveau d'exposition (fort versus faible, en utilisant les quartiles - en pratique comparaison du quartile le plus bas versus le quartile le plus haut) au principal métabolite des diesters phtalates, le MEHP (mono 2-ethylhexy phtalate).

Paramètres utilisés :

Principaux indicateurs sociodémographiques,

Dosages urinaires des phtalates,

Taux des hormones reproductives (testostérone, LH, FSH, SHBG, Inhibine B, Estradiol, plus quelques ratios en particulier le taux d'androgène libre (FAI), calculée par testostérone totale x 100/SHBG),

Principaux paramètres spermatiques.

Analyses statistiques : Prise en compte des facteurs de confusion et ajustements, transformation logarithmique de certaines variables, analyses de régression.

Principaux résultats :

Niveau détectable > 95% des métabolites des phtalates

Différence très significative de la SHBG, pour le MEHP, entre le quartile le plus élevé et le plus faible

Différence significative (mais p= 0.03) pour la FSH.

Le FAI et le FAI/LH apparaissent également très significatifs mais ces résultats sont essentiellement dus à la SHBG !!!

Aucune différence significative (après ajustement) pour les différents paramètres spermatiques – en pratique seul le volume spermatique montrait un p égal à 0.01

Conclusion des auteurs : Si dans le résumé les auteurs « suggèrent » que la production de testostérone et les mécanismes de contrôles hypothalamo-hypophysaires « pourraient être touchés » chez les individus présentant un taux d'excrétion élevé des métabolites des phtalates, leurs conclusions apparaissent beaucoup plus nuancées, notant simplement « des différences

modérées au niveau hormonal » et surtout n'apportant aucun caractère de causalité aux effets observés, suggérant même que leurs résultats pourraient aussi refléter un processus de « détoxification plus faible chez certains hommes », voire des résultats qui refléteraient l'implication d'autres composés chimiques utilisant les mêmes voies de dégradation.

#### Qualité de l'étude et conclusion proposée :

Etude de très bonne qualité méthodologique (et nettement supérieure aux études précédentes sur le même sujet, eu égard en particulier au nombre d'individus enrôlés, aux méthodes diagnostiques et statistiques) et menée par une équipe reconnue dans le domaine.

Peu de biais majeurs

Utilisation statistique des quartiles justifiable certes mais allant dans le sens d'une prise en compte des plus grandes différences (utilisation et comparaison du quartile le plus bas versus le plus élevé, donnant alors prise aux valeurs très basses et très hautes)

Utilisation des résultats « quelque peu abusif » pour le FAI et du FAI/LH, ceux-ci reflétant essentiellement la différence majeure observée dans le taux de SHBG !

Aucune différence quant aux paramètres spermatiques contredisant les quelques résultats ponctuels publiés sur ce domaine et déjà soumis à de nombreuses critiques.

En conclusion, une très bonne étude de référence ne montrant pas d'altération majeure et significative des hormones reproductives, ni des paramètres spermatiques, en fonction du niveau d'exposition aux phtalates (du moins, au métabolite MEHP) ; seule la SEGB sembler impliquée mais il semble difficile, à ce niveau, de proposer un mécanisme physiopathologique se rapportant uniquement à la SEGB.

**Annexe 23 : Grille d'analyse de l'étude de Mendiola J. et al. Associations between urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormones in fertile men International Journal of Andrology 2012, 34: 369-378.**

Design

Etude prospective

Modalités

Recrutement via la cohorte « Study for Future Families - SFF » ; couple dont la femme est enceinte (sans PMA) recruté dans les consultations prénatales entre 1999 et 2005 (plusieurs sites aux USA) – questionnaire pour les hommes et 1 prélèvement urinaire et sanguin (même jour) SFF sur les patientes incluses *via* leurs dossiers médico-obstétricaux (âge gestationnel, rang de naissance, âge de la mère, tabac).

Dosages de MEHP, MEHHP, MEOHP, MECPP, MCP, MEP, MBzP, MCNP, MCOP, MiBP, MBP – FSH, LH, SHBG, testostérone, FAI (testostérone totale/SHBG x 100) - Testostérone libre (à partir de la testostérone totale, albumine, et SHBG via l'équation de Vermeulen – réf donné – 1999) - Relation entre hormones reproductives et somme des métabolites du DEHP

Régressions logistiques - sn cas de concentration inférieure à la LOD, application d'une  $LOD/\sqrt{2}$ .

Résultats

Sur les 950 hommes participant à la cohorte SFF, 425 ont eu les dosages en intégralité et seulement 363 ont finalement été inclus (avec l'ensemble des informations sollicitées)

Testostérone totale, libre et FAI significativement corrélé (à la baisse) avec les 4 métabolites urinaires du MEHP mais après ajustement différence non significative sauf pour FAI – SHBG significativement lié avec MEHP mais différence non observée après ajustement.

Conclusions des auteurs

Exposition au DEHP chez les hommes féconds pourrait être associée à des altérations mineures des marqueurs de la testostérone libre.

Rôle possible (négatif) des phtalates (MEHP) sur les cellules de Leydig - rôle potentiel du MEHP sur la SHBG au niveau hépatique.

Limite forte liée à un seul prélèvement urinaire.

En conclusion

Etude retenue (malgré les limites inhérentes à un prélèvement urinaire unique) montrant l'absence globale d'effet des métabolites des phtalates sur les hormones reproductives, excepté une possible association, faible, sur la testostérone libre et plus spécifiquement sur la SHBG.

## Annexe 24 : Suzuki Y, *et al.* Foetal exposure to phthalate esters and anogenital distance in male newborns. *International Journal of Andrology* 2012, 35: 236-244.

### Design

Etude prospective (modalités précises et dates d'inclusion inconnues) menée dans le centre hospitalier des Forces de Défenses de Tokyo.

344 femmes enceintes recrutées via leur gynécologue et ayant accepté de donner un échantillon d'urines et de faire examiner leur enfant à la naissance.

120/344 ayant accouchées en dehors du centre hospitalier des Forces de Défenses de Tokyo n'ont pas été incluses - 111/244 femmes ayant accouchées dans le centre hospitalier des Forces de Défenses de Tokyo et ayant donné naissance à un garçon, constituent la population d'étude.

### Modalités

Information sur les patientes incluses via leurs dossiers médico-obstétricaux (âge gestationnel, rang de naissance, âge de la mère, tabac).

Un prélèvement urinaire (récipient en polypropylène) effectué entre la 9<sup>ème</sup> et la 40<sup>ème</sup> semaine.

Dosages de MMP, MEP, MnBP, MBzP, MEHP, MEHHP, MEOHP – dosages des isoflavones urinaires - correction des dosages faites en utilisant la « gravité spécifique urinaire » ... pour éliminer les effets de dilution ?

A la naissance, mesure de la distance anogénitale (AGD) en AGD1 et AGD2 selon le bord génital retenu – l'AGD2 semblant correspondre à la distance anosrotale utilisée dans l'étude de Swan en 2005 ! Mesures anogénitales effectuées par 23 cliniciens / ajustement en fonction du poids de l'enfant à la naissance donnant un index de la distance « AGI », soit AGI1 et AGI2.

### Résultats

Relation statistiquement significative, « négative », entre MEHP et AGI 1 -  $p=0.05$

AGI1 et AGI2 augmentés en cas d'usage de tabac chez la femme versus non-usagère –  $p=0.03$  et  $p=0.05$  conformes aux données de la littérature sur facteurs de risques du cancer du sein (parité, allaitement, date du premier enfant, BMI).

Dans le modèle de régression multiple persistance de la relation significative entre MEHP et AGI1 (relation négative –  $p=0.02$ ) entre MEHP et âge maternel (relation positive –  $p=0.04$ ), entre MEHP et tabac (relation négative –  $p=0.02$ ).

### Conclusions des auteurs

Association MEHP et anomalies reproductives masculines.

Nombre faible de femmes inclus dans l'analyse du statut tabagique (pas de précision sur durée, quantité de cette exposition) – pas d'explication physiopathologique entre tabac et anomalies urogénitales à la naissance.

Pas de signification retrouvée pour MEP et MnBP, en contradiction avec les résultats de Swan.

Biais majeur lié au nombre élevé de cliniciens ( $n=23$  pour 111 nouveau-nés examinés) ayant mesuré l'AGD1 et AGD2.

### En conclusion

#### Etude non retenue

*Dosage urinaire unique – pas d'information sur de possibles expositions professionnelles antérieures ou au moment du prélèvement urinaire.*

*Biais majeur lié à la fiabilité de la mesure de la distance anogénitale (multiplicité des évaluateurs).*

*Résultats statistiques peu robustes – faible nombre de personnes incluses.*

**Annexe 25 : Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal Phtalate exposure Swan SH, *et al.* Environment Health Perspectives 2005 ; 113(8):1056-1061**

Remarque	Pour l'analyse de cette étude importante (première étude épidémiologique portant sur l'exposition aux phtalates et des conséquences éventuelles sur la reproduction masculine), cf. synthèse réalisée par Luc Multigner dans Environnement, Risques et Santé. 2007 ; 6(1):5-7
----------	---

**Annexe 26 : Grille d'analyse de l'étude de Bethany R. Hannas, Toxicol. Sciences 2011. Dose-Response Assessment of Fetal Testosterone Production and Gene Expression Levels in Rat Testes Following In Utero Exposure to Diethylhexyl Phthalate, Diisobutyl Phthalate, Diisoheptyl Phthalate, and Diisononyl Phthalate**

Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Prénatale
Objectif de l'étude	- Effet dose de différents phtalates, DIHP, DIBP et DINP en comparaison avec le DEHP sur la testo fœtale, expression InsL3, Star et cyp 11a1 - Effet espèce: Wistar vs SD - Effet additif de 9 phtalates?
Rapport d'études, publications scientifiques ou revue	-
Respect BPL – lignes directrices	
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	
Financement de l'étude	
Substances chimiques, n°CAS, pureté, composition, véhicule	DEHP : CAS 117-81-7 DIHP : CAS 71888-89-6 DIBP : CAS 84-69-5 2 formules du DINP testés : CAS 28553-12-0① et CAS 68515-48-0② BBP : CAS 85-68-7 DCHP dicyclohexyle : CAS84-61-7 di (n) heptyle phtalate ou (D ( heptyle )P : CAS 3648-21-3 phtalate de dinhexyle( D ( hexyle ) :CAS 84-75-3 DPEP : CAS ??
Espèce / souche étudiée / âge - poids	SD et W Femelles gestantes, croisement fait soit chez Charles River (CR) soit chez Harlan (H), GD1-2 au laboratoire
Sexe et nombre d'animaux par lot	Femelles gestantes
Groupe témoin et nombre	Groupe témoin neg. et groupes exposés
Témoin positif	-
Conditions de vie (T, humidité, cycle lumière, alimentation, nbr animaux/cage)	1 F gestante / cage (polycarbonate) 22°C–23°C, 50–60% humidité, 14L/10N Alimentation : « pregnancy diet of Purina Rat Chow 5008 »pour les animaux Charles River damset « NIH 07 breeding diet »pour les animaux Harlan. Eau filtrée et contrôlée en pesticides, métaux lourds et autres produits chimiques
Voie d'exposition	Orale ; huile de maïs



Fréquence et durée de l'exposition	GD14-18
Doses / concentrations d'expositions (indiquer s'il s'agit de valeurs nominales ou mesurées)	<p>1<sup>ère</sup>exp.: SD et W (CR) rattes gestantes (3-6/gpe); 0 ou 100, 300, 500, 625, 750, 875 mg <b>DEHP</b>/kg/j</p> <p>2<sup>nde</sup>exp.: SD (CR) rattes gestantes (4/gpe); 0, 100, 300,600 et 900 mg <b>DIHP</b>/kg/j</p> <p>3<sup>ème</sup>exp.: SD (H) rattes gestantes (3/gpe) ; 0, 100, 300, 600, 900mg <b>DIBP</b>/kg/j</p> <p>4<sup>ème</sup>exp. : Harlan SD (H) rattes gestantes ;0 ou 500, 750, 1000, 1500 mg DINP/kg/j. 2 formules du <b>DINP</b> testés : 1/ ⊕ 3-6/gpe et 2/ ⊙3/gpe</p> <p><b>DPeP</b> : Harlan SD; 0 ou 11, 33, 100, or 300 mg/kg/j</p> <p><u>Mixture de 9 phtalates</u> : SD (H) rattes gestantes, (1) DEHP, (2) DIHP, (3) DIBP, (4) DBP, (5) BBP, (6) DCHP, (7) D (heptyl)P, (8) D (hexyl)P et (9) DPEP. 5 dilutions 100, 67, 33, 17, 8 et 0% de la dose maximale de 650 mg/kg/j de phtalate total, soit 10 mg DPEP/kg/j et de 80mg/kg/j pour les autres.</p> <p>N= 8, 3, 4, 7, 4, et 3 portées, respectivement, 0, 8, 17, 33, 67 et100%.</p>
Observations / paramètres étudiés	<p>Sacrifice des femelles gestantes à GD18.</p> <p>Production de testostérone testiculaire fœtale ex vivo</p> <p>Expression de gènes testiculaires</p> <p>qPCR : insl3, StAR, and Cyp11a</p> <p>DIHP, stimulation par l'hCG</p>
Exposition non contrôlée (présence de phyto-œstrogènes dans le régime alimentaire, polycarbonate dans les cages d'hébergement, composition de l'eau de boisson, composition de la litière, etc.)	<p>Alimentation ?</p> <p>Eau contrôlée</p>
Analyse statistique et critère de qualité associé	RAS
Effets observés – toxicité générale / maternelle	Pas d'effets toxiques chez les femelles gestantes
Effets observés – métabolisme	-
Effets observés – reprotoxicité	<p>DIBP et DIHP √ production de testo intratesticulaire fœtale de manière identique au DEHP (300). DEHP √ expression InsL3 (625)</p> <p>DINP√ production de testo intratesticulaire (500) mais est 2,3 fois moins puissant, idem pour l'expression des ARN<sub>m</sub> de Star et Cyp11a (1000 et 1500, respectivement).</p> <p>Expression de ARN<sub>m</sub>StAR : « classement des effets » DPeP&gt; DIBP-DEHP&gt; DINP ; pour cyp11a1 : DPeP-DIBP &gt; DEHP &gt; DINP</p> <p>Le mélange des 9 phtalates √ production de testo intratesticulaire fœtale de manière dose-dépendante et de façon additive.</p> <p>Pas d'effets inter-souches évidents (DEHP).</p>
Effet critique pris en compte	<p>√Testo intra testiculaire fœtale</p> <p>√Expression des gènes suivants : InsL3, Star et cyp11a1</p>
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique	

Conclusions des auteurs	
Commentaires et conclusions du relecteur	<p>Etude intéressante montrant des effets de phthalates peu étudiés ayant des effets négatifs à la fois sur la production de testo intra testiculaire fœtale et sur l'expression de InsL3, Star et cyp11a1. Parmi ces phthalate, il y a le DIBP qui a des effets semblables au DEHP, à noter que ce phthalate, du fait d'une structure très proche du DBP, est utilisé comme son substitut.</p> <p>Le DIHP et le DINP sont aussi couramment utilisés. Le DINP semble beaucoup moins « puissant » que les autres étudiés.</p> <p>Ce travail suppose un effet additif des phthalates.</p> <p>Les auteurs se posent aussi la question d'effets inter espèces. Le travail a donc été mené chez le SD et le W, uniquement pour l'exposition au DEHP. Ils concluent à une différence inter-espèce mineure.</p> <p>Effectif : on part de 3 à 6 portées par groupe d'exposition et au total, on a 2 à 9 mâles par groupe analysés (en moyenne, 3 à 4)</p> <p>Pourquoi les SD viennent-ils soit de chez CR soit de chez H, avec une nourriture différente ???? Introduction d'un biais ? Pourquoi ne pas faire simple ?</p>



Agence nationale de sécurité sanitaire  
de l'alimentation, de l'environnement et du travail

14 rue Pierre et Marie Curie  
94701 Maisons-Alfort Cedex

[www.anses.fr](http://www.anses.fr)

[www.anses.fr](http://www.anses.fr) / [@Anses\\_fr](https://twitter.com/Anses_fr)