

ANNÉE 2016

N° 037
(complété par la scolarité)

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

Soutenu devant le jury interrégional

Le 07 octobre 2016

Par *Pierre Gabriel PINTA*

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février 2012

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Etude de biocompatibilité des plastifiants alternatifs au
DEHP et de leurs métabolites primaires.

Président :

Monsieur le Docteur Antoine DUPUIS, Pharmacien MCU-PH, CHU de Poitiers

Membres du jury :

Monsieur le Professeur Gaël GRIMANDI, Pharmacien PU-PH, CHU de Nantes

Madame le Docteur Emmanuelle OLIVIER, Pharmacien PH, CHU de Nantes

Monsieur le Docteur Nicolas PREVOST, Pharmacien assistant, CHU de Nantes

Liste des abréviations

2-EH : 2-éthylhexanol

2-Cx-MMHP: Mono-2-(carboxyméthyl)hexyle phtalate

5-Cx-MEPP: Mono-2-éthyl-5-carboxypentyle phtalate

5-oxo-MEHP: Mono-2-éthyl-5-oxohexyle phtalate

5-OH-MEHP: Mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyle phtalate

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

AR : Androgene receptors

ARMED: Assessment and Risk Management of Medical Devices in plasticized polyvinylchloride

ARMED NEO: Assessment and Risk Management of Medical Devices in plasticized polyvinylchloride in neonatology

CAR : Constitutive Activated Receptor

CAS : chemical abstract service

CE 50 : Concentration Efficace 50

CEC : circulation extracorporelle

CLP : Classification Labelling and Packaging

CMR : Cancérogène-Mutagène-Reprotoxique

CxMINCH : Carboxymonoisononyl cyclohexane

DEHA : di-2-éthylhexyle adipate

DEHP : di-2-éthylhexyle phtalate

DEHT : di-2-éthylhexyle terephtalate

DINCH : Diisononyl cyclohexane

DINP : diisononyle phtalate

DM : dispositif médical

DMEM: Dubelco's Modified Eagle Medium

DMSO: diméthyle sulfoxide

DO: densité optique

ECMO : extracorporeal membrane oxygenation

EN : norme européenne

ER : Oestrogen receptors

EVA : acétate d'éthyle de vinyle

ISO : Organisation internationale de normalisation

IV : intraveineux

LIOAD : Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire

LOAEL : Low observable adverse effect level

MEHP: mono-2-éthylhexyle phtalate

MEHA: monoéthylhexyle adipates

MEHT : Mono ethylhexyle téréphtalate

MeMOCH : Methylmonoethyl cyclohexane

MeMOP : Methylmonoethyl phtalate

MINCH : Mono isononyl cyclohexane

MINP: monoisononyl phtalate

MOTM : Mono octyle trimellitate

MTT: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium)

NF: norme française

NOAEL: no observable adverse effect level

NTP : Nutrition totale parentérale

OH-MINCH: Hydroxymonoisononyl cyclohexane

OXO-MINCH : Oxomonoisononyl cyclohexane

P.O: *per os*

PBS : Phosphate saline buffer

PE: polyéthylène

PEG 400: polyéthylène glycol

PP: polypropylène

PPAR : Peroxysome proliferative activator receptors

P/S: Pénicilline / streptomycine

PUR: polyuréthane

PVC: polychlorure de vinyle

PXR : Pregnant X Receptor

SCENIHR: Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks

Solution M: solution mère

SVF : sérum de veau fœtal

TOTM : Trioctyle trimellitate

TPA : acide téréphtalique

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Organigramme de tâches des différents partenaires du projet ARMED.

Figure 2 : Structure générale des phtalates.

Figure 3 : Structure du DEHP.

Figure 4 : Métabolisme du DEHP chez l'homme (d'après Koch JM et al. 2005) [11]

Figure 5: Récepteurs cibles des phtalates

Figure 6 : Diagramme de gestion de risque associé à l'exposition aux DM en PVC-DEHP.

Figure 7 : courbe Effet-Dose exprimant la NOAEL d'une substance à tester.

Figure 8 : MTT test. Formation de cristaux de formazan.

Figure 9: Plan de plaque par jour (J1-J7).

Figure 10 : Métabolites primaires synthétisés des plastifiants alternatifs

Figure 11: Limite de solubilité des plastifiants dans du DMSO coloré au bleu trypan.

Figure 12 : Contrôle positif de mort cellulaire par l'Actinomycine D. a) En bleu, densité optique des puits contrôle de J1-J5. En rouge, densité optique des puits traités par l'actinomycine D de J1-J5. b) Pourcentage de viabilité spécifique des cellules traitées par l'actinomycine D par rapport au contrôle de J1-J5. * $p < 0.05$ Actinomycine D vs contrôle.

Figure 13 : Linéarité du test MTT. Il est observé une augmentation proportionnelle de la densité optique en fonction de l'augmentation du nombre de cellules dans les puits.

Figure 14: Densités optiques des conditions contrôle et traitées par un pourcentage croissant de DMSO (0.1%, 0.5%, 1%, 2.5% et 5%) à J1, J4 et J5. * $p < 0.05$ cellules traitées par un % en DMSO vs condition contrôle.

Figure 15: Test de cytotoxicité des plastifiants à 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) à J7. Résultats de viabilité cellulaire obtenus par le test MTT. Les cellules L929 ont étéensemencées à 104 cellules/puits et cultivées pendant 7 jours sous 3 conditions avec un changement quotidien de milieu de culture : un contrôle (milieu complet), un contrôle DMSO (milieu complet supplémenté par du DMSO à 0.1%, 0.5% et 1%) et un test (Solutions filles de plastifiants diluées dans du milieu de culture complet à 0.1% (0.01 mg/mL), 0.5% (0.05 mg/mL) et 1% (0.1 mg/mL). Le test MTT et l'estimation de la viabilité cellulaire ont été effectués tous les jours.

Figure 16: Test de cytotoxicité des métabolites primaires à 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) à J7. Résultats de viabilité cellulaire obtenus par le test MTT. Les cellules L929 ont étéensemencées à 104 cellules/puits et cultivées pendant 7 jours sous 3 conditions avec un changement quotidien de milieu de culture : un contrôle (milieu complet), un contrôle DMSO (milieu complet supplémenté par du DMSO à 0.1%, 0.5% et 1%) et un test (Solutions filles de métabolites primaires diluées dans du milieu de culture complet à 0.1%

(0.01 mg/mL), 0.5% (0.05 mg/mL) et 1% (0.1 mg/mL). Le test MTT et l'estimation de la viabilité cellulaire ont été effectués tous les jours.

Figure 17 : Synthèse de la cytotoxicité des plastifiants et leurs métabolites primaires sur les cellules L929 aux concentrations de 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL et 0.1 mg/mL.

Figure 18 : Test de cytotoxicité du DEHP aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Figure 19 : Test de cytotoxicité du TOTM aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Figure 20 : Test de cytotoxicité du DEHA aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Figure 21 : Test de cytotoxicité du DEHT aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Figure 22 : Test de cytotoxicité du DINP aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Figure 23 : Test de cytotoxicité du DINCH aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Figure 24 : Test de cytotoxicité du MEHP aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Figure 25 : Test de cytotoxicité du MOTM aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Figure 26 : Test de cytotoxicité du MEHA aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Figure 27 : Test de cytotoxicité du MEHT aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Figure 28 : Test de cytotoxicité du MINP aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Figure 29 : Test de cytotoxicité du MINCH aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Figure 30 : Test de cytotoxicité du MeMOCH aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Tableau 1 : Exemples de DM contenant des phtalates en fonction de la voie d'abord.

Tableau 2 : Synthèse des données de toxicité chez l'animal.

Tableau 3 : Plastifiants alternatifs du DEHP et leurs principaux métabolites secondaires.

Tableau 4 : Synthèse des données sur les plastifiants alternatifs au DEHP.

Tableau 5 : Plastifiants alternatifs au DEHP.

Tableau 6 : Résultats dosages des solutions mères de plastifiants par GC/MS. (n=3)

Tableau 7: Récapitulatif des NOAEL des plastifiants alternatifs.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	9
I LE PVC ET LES PHTALATES	13
I.1 LE POLYCHLORURE DE VINYLE (PVC)	13
I.2 LES PHTALATES	14
I.3 FACTEURS D'EXPOSITION AU DEHP	15
I.4 METABOLISME DU DEHP	17
I.6 ALTERNATIVES A L'UTILISATION DU DEHP DANS LES DM EN PVC PLASTIFIE	21
I.6 BIOCOMPATIBILITE DES DISPOSITIFS MEDICAUX	26
II MATERIELS ET METHODES	29
MATERIELS :	29
METHODES :	30
II.1 SYNTHESE DES METABOLITES	30
II.2 SOLUBILISATION DES PLASTIFIANTS	30
II.3 CULTURE CELLULAIRE	30
II.4 ESTIMATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE : TEST MTT	31
II.5 SPECIFICITE ET LINEARITE DU TEST MTT	31
SPECIFICITE	31
LINEARITE	32
II.6 TESTS DE BIOCOMPATIBILITE	32
II.6.a Tests de viabilité du DMSO	32
II.6.b Tests de viabilité des plastifiants alternatifs et leurs métabolites	32
II.4 ANALYSE STATISTIQUE	33
III RESULTATS	34
III.1 SYNTHESE DES METABOLITES PRIMAIRES DES PLASTIFIANTS	34
III.2 SOLUBILISATION DES PLASTIFIANTS	34
III.3 SPECIFICITE ET LINEARITE DU TEST MTT	36
<i>Spécificité</i>	36
<i>Linéarité</i>	36
III.4 TEST DE CYTOTOXICITE	37
III.4.a Test de cytotoxicité du DMSO	37
III.4.b Test de cytotoxicité des plastifiants	38
IV DISCUSSION	42
CONCLUSION	49
BIBLIOGRAPHIE	50
ANNEXE	55

INTRODUCTION

Selon la directive 2007/47/CE et l'article R5211 du code de la santé publique, un dispositif médical se définit comme tout instrument, appareil, équipement, logiciel, matière ou autre article, utilisé seul ou en association, ainsi que tout accessoire, y compris le logiciel destiné par le fabricant à être utilisé spécifiquement à des fins diagnostique et/ou thérapeutique, et nécessaire au bon fonctionnement de celui-ci, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins:

- de diagnostic, de prévention, de contrôle, de traitement ou d'atténuation d'une maladie,
- de diagnostic, de contrôle, de traitement, d'atténuation ou de compensation d'une blessure ou d'un handicap,
- d'étude, de remplacement ou de modification de l'anatomie ou d'un processus physiologique,
- de maîtrise de la conception,

L'action principale voulue dans ou sur le corps humain n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais peut être assistée par de tels moyens [1].

Les matériaux entrant dans la composition des dispositifs médicaux (DM) sont appelés biomatériaux. Ils peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Quelque soit son origine, un biomatériau doit être biocompatible et permettre le maintien de la biofonctionnalité du dispositif médical. Le choix du biomatériau dépend de 6 critères principaux:

- sa biocompatibilité,
- ses performances mécaniques,
- sa facilité de mise en œuvre,
- sa compatibilité avec les solutions médicamenteuses,
- sa disponibilité
- et enfin de son prix.

Les performances des biomatériaux peuvent être améliorées par l'ajout d'adjuvants et il n'existe pas de formule "générique" de matériaux utilisés dans la fabrication des DM. Parmi les biomatériaux synthétiques, les polymères tels que le polystyrène, les polyoléfines et le polychlorure de vinyle (PVC) sont couramment utilisés dans la fabrication des DM. En France, le PVC représentait 6% des principales matières plastiques utilisées dans le domaine médical en 2002.

Pour améliorer les performances mécaniques du PVC, notamment, sa plasticité, il est d'usage de rajouter des plastifiants dans la composition des DM. Les phtalates sont des plastifiants parfaitement adaptés à cet effet. Parmi ceux-ci, le di-2-ethylhexyle phtalate (DEHP) est le phtalate le plus utilisé. Depuis longtemps, il a été montré que, sous certaines conditions, le DEHP peut migrer de la matrice du dispositif médical vers la solution qu'il contient ou qu'il véhicule et être administré au patient.

En 2008, le DEHP a été classé comme substance Cancérogène, Mutagène et Reprotoxique classe 1B en accord avec la réglementation CLP (classification, labelling and packaging) de l'union Européenne [2]. Il a donc été nécessaire pour les industriels de rechercher une alternative à son utilisation dans les DM en PVC et de nombreux matériaux ont été proposés pour le remplacer.

Face à cette problématique de substitution du DEHP dans les DM en PVC, le CHU de Clermont-Ferrand a répondu à un appel à projet de l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) et a initié un projet d'évaluation et de gestion des risques liés aux DM en polychlorure de vinyle plastifié au DEHP : ARMED (Assessment and Risk Management of Medical Devices in plasticized polyvinylchloride).

L'objectif du projet ARMED est d'évaluer le risque associé à la migration des plastifiants des DM et proposer des solutions pour la gestion de ce risque. Ce projet implique plusieurs partenaires à savoir l'Université de Clermont-Ferrand, l'Université de Lille 2 et l'Université de Nantes à travers le LIOAD (Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire, INSERM UMRS 791). (Figure1)

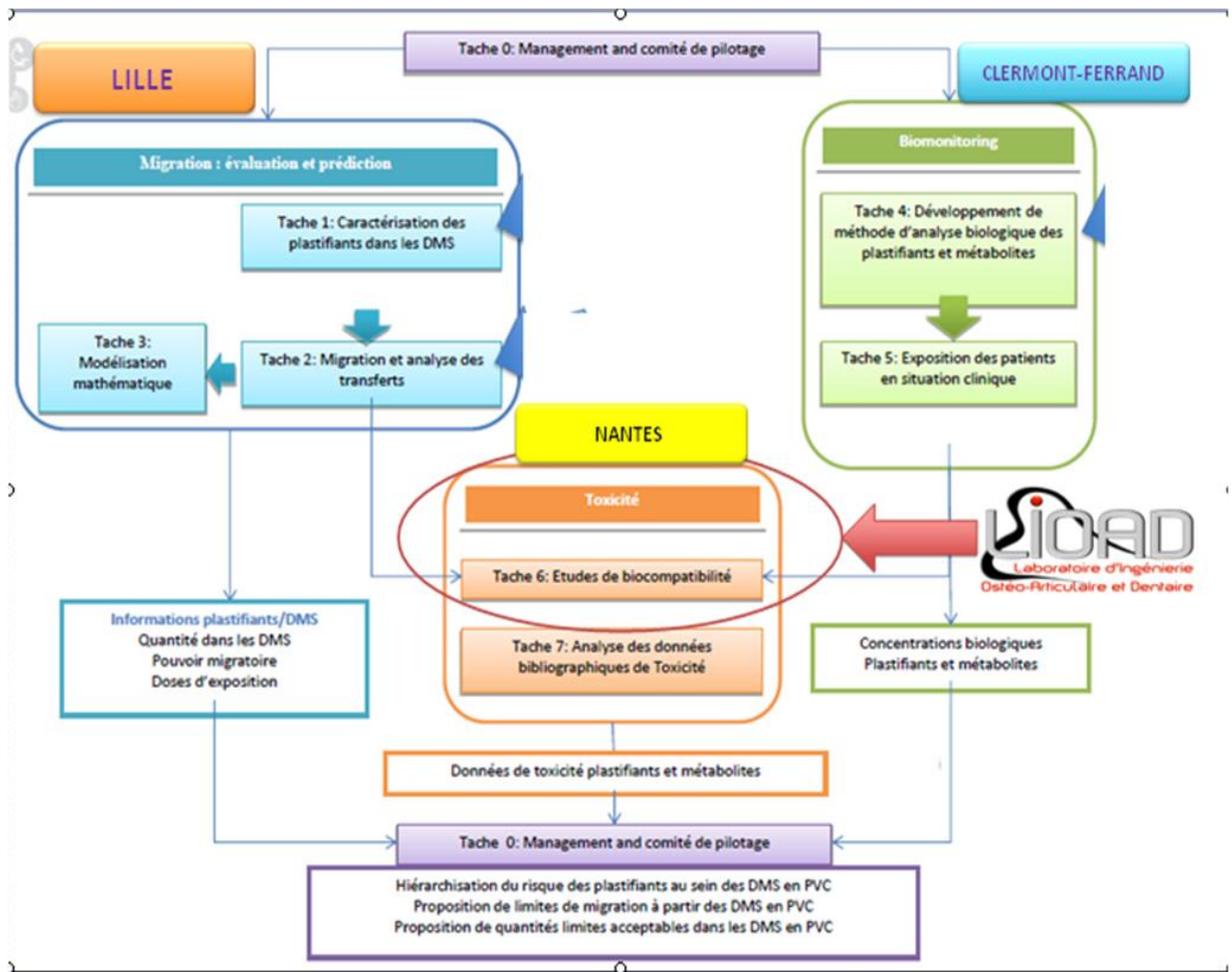


Figure 1 : Organigramme de tâches des différents partenaires du projet ARMED.

Dans ce cadre, nous avons été en charge du développement des études de biocompatibilité des plastifiants alternatifs au DEHP et de leurs principaux métabolites primaires. L'évaluation de la biocompatibilité des DM a été effectuée suivant les exigences de la norme européenne EN NF 10 993 relative à l'évaluation biologique des DM [3].

Nos différents travaux ont consisté à tester la cytotoxicité des plastifiants sélectionnés en conformité avec la norme NF EN ISO 10 993-5 [4].

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés à partir des plastifiants à l'état pur pourtant les différents tests décrits dans la norme n'intègrent pas les tests à partir des adjuvants à l'état pur. La norme recommande des tests de cytotoxicité à partir des DM. Les biomatériaux et additifs utilisés pour la fabrication des dispositifs médicaux ne sont jamais testés séparément. Ainsi, lorsque le DM est constitué d'un seul biomatériau, les résultats des différents tests lui

sont attribués. Par contre, lorsque le DM est constitué de plusieurs biomatériaux, il est difficile d'imputer les résultats des différents tests à l'un des biomatériaux ou aux additifs. Notre choix a été motivé par le fait que certaines conditions cliniques sont à risques d'exposition aux adjuvants des biomatériaux. Les conditions d'extraction décrites dans la norme lors des tests à partir d'extraits sont souvent insuffisantes pour extraire les adjuvants qui sont libérés du DM lors de son utilisation clinique. Dans notre cas précis, un simulant telle qu'une solution de chlorure de sodium mentionnée dans la norme n'est pas assez hydrophobe pour décrocher les plastifiants de la structure du PVC.

I Le PVC et les phtalates

I.1 Le polychlorure de vinyle (PVC)

Le polychlorure de vinyle (PVC) est un dérivé d'hydrocarbures. Il s'obtient par polymérisation de monomères de chlorure de vinyle (- CH₂CHCL -) constituant ainsi un homopolymère linéaire. Le PVC est un matériau thermoplastique pouvant être fondu et modelé tout en gardant ses caractéristiques. Afin d'optimiser son utilisation dans des applications bien précises, il est nécessaire d'ajouter des plastifiants lors du procédé de fabrication du produit final. Sans adjonction de plastifiants, le PVC est un matériau rigide du fait de l'absence de glissement de ses macromolécules les unes sur les autres. Il existe plusieurs familles chimiques de plastifiants qui peuvent être utilisées. De part leurs caractéristiques et les excellentes performances conférées au PVC, les phtalates constituent les plastifiants les plus utilisés pour la plastification du PVC. Ils lui confèrent une excellente flexibilité et facilitent sa mise en forme.

En raison de ses excellentes propriétés, sa biocompatibilité, sa transparence, sa facilité de stérilisation, son faible coût et sa facilité de fabrication ; le PVC plastifié est utilisé dans la fabrication d'un grand nombre de dispositifs médicaux entrant en contact direct ou indirect avec le patient. Les voies de contact sont liées à l'utilisation clinique. Quelques exemples de voies d'abord de DM en PVC sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Exemples de DM contenant des phtalates en fonction de la voie d'abord.

VOIES D'ABORD	EXEMPLES DE DISPOSITIFS MEDICAUX
ABORD RESPIRATOIRE	Tubulures de ventilation Masques et lunettes à oxygène Canules de trachéotomie
ABORD VEINEUX	Poches de stockage IV Sets de perfusion IV Cathéters Sets de transfusion sanguine Poches de produits sanguins Lignes d'hémodialyse Lignes de circulation extracorporelle (CEC) Lignes d'ECMO (Extracorporeal membrane oxygenation) Poches de nutrition parentérale
ABORD DIGESTIF	Sondes de nutrition entérale Poches de nutrition entérale
ABORD CUTANE	Gants d'examen

I.2 Les phtalates

Sur le plan structural, les phtalates possèdent un noyau aromatique sur lequel est fixé deux groupements esters en ortho (Figure 2). Sur le plan physico-chimique, ils se présentent sous forme de liquides organiques visqueux, transparents, incolores et très peu volatils à température ambiante. Ils présentent une très faible solubilité dans l'eau de part leur caractère hydrophobe. A l'inverse, ils présentent une très forte affinité pour les graisses et les polyalcools.

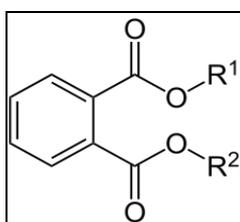


Figure 2 : Structure générale des phtalates.

L'ajout de phtalates au cours de la fabrication des DM confère au PVC des propriétés telles que la souplesse et la plasticité (élasticité et extensibilité). Le plastifiant agit comme un lubrifiant moléculaire, car mobile au sein de la structure du polymère. La liaison entre le phtalate et le PVC est de type faible. En conséquence, il peut diffuser dans le polymère solide et être libéré de sa structure en fonction de la solubilité dans les solutions au contact du DM en PVC. Il se pose la problématique des quantités de phtalates qui peuvent être libérées au cours de l'utilisation du DM en clinique [5,6].

Parmi les phtalates entrant dans la synthèse des DM, le di-2-ethylhexyle phtalate (DEHP) est le plus utilisé. Il correspond à de l'acide phtalique estérifié par deux chaînes d'ethylhexanol (Figure 3).

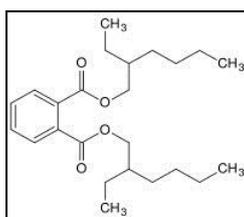


Figure 3 : Structure du DEHP.

I.3 Facteurs d'exposition au DEHP

Les facteurs favorisant le relargage du DEHP sont de plusieurs origines telles que:

- **La concentration en DEHP dans le DM :**

Les DM en PVC peuvent contenir jusqu'à 50% (w/w) de plastifiants. L'utilisation de grandes quantités de DEHP augmente le risque de relargage du DM.

- **La stabilité du DEHP au sein du PVC :**

Le DEHP n'est pas lié chimiquement au PVC. Ainsi, il peut facilement diffuser, entraînant sa désorption par les solutions et les fluides au contact du DM.

- **La nature des solutions au contact du DM :**

Le DEHP présente une forte affinité pour les substances hydrophobes, les lipides et les protéines. L'administration de solutions de nutrition par voies entérale et parentérale, la nébulisation de médicaments constituent des situations à risques de décrochage et d'exposition au DEHP. De même, le DEHP est fixé majoritairement par les lipides de bas poids moléculaire, les protéines sanguines (telles que l'albumine), les globules rouges et les plaquettes [7].

- **Les conditions de stockage :**

La température, l'hygrométrie peuvent influencer sur le relargage de DEHP.

- **L'effet de la stérilisation :**

Des études ont montré que l'irradiation provoque une dénaturation du PVC et une transformation du DEHP en son principal métabolite toxique le MEHP (Mono 2-ethylhexyle phtalate) [8].

- **La surface de contact DM / contenu :**

Plus la surface de contact est importante, plus le risque de décrochage du DEHP augmente.

- **La durée de contact avec le DM en PVC plastifié :**

L'utilisation des DM en PVC plastifié sur une longue durée augmentent le risque d'exposition au DEHP.

- **La fréquence d'exposition avec le DM en PVC plastifié :**

Des contacts fréquents avec des DM en PVC plastifié augmentent le risque d'exposition au DEHP.

- **Les conditions et la nature de l'acte médical**

En 2008, le **SCENIHR** (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) s'est intéressé pour une première fois aux dispositifs médicaux en PVC plastifié au DEHP et a évalué les actes à risques en fonction de la population exposée à ces DM [9]. Le **SCENIHR** est un comité scientifique constitué d'experts européens dont la mission est d'étudier et d'émettre des avis sur les nouveaux risques potentiels pour la santé. Ces recommandations de 2008 ont été renforcées par un nouveau rapport paru en 2015 et révisé en juin 2016. Les actes et populations à risques identifiés sont :

- **En néonatalogie** : Transfusion
ECMO (ExtraCorporal Membrane Oxygenation)
Nutritions parentérale et entérale
- **Chez le garçon pré pubertaire** : Hémodialyse
- **Chez la femme enceinte ou allaitant** : Hémodialyse
- **Chez les adultes** : Transfusion massive
Chirurgie cardiaque, ECMO, CEC (Circulation ExtraCorporelle)
Nutrition entérale
Hémodialyse, dialyse péritonéale continue

Les nouveaux nés et les femmes enceintes représentent des populations à haut risque d'exposition lié au passage transplacentaire et dans le lait maternel du DEHP.

Par extrapolation des données animales et des études épidémiologiques, le DEHP a été classé **reprotoxique de classe 2** pour l'espèce humaine selon la classification des substances cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques (CMR) en accord avec la directive 67/548/CEE [21]

renforcée par la nouvelle classification CLP. La directive européenne 2007/47/CEE [1] a renforcé les exigences sur l'utilisation des phtalates dans les DM en PVC, notamment :

- ✓ L'obligation d'étiquetage spécifique des DM en PVC contenant des phtalates (DEHP).
- ✓ Des justifications et des mesures de précautions appropriées dans le cas où les DM sont destinés aux femmes enceintes ou aux enfants hospitalisés en néonatalogie.

I.4 Métabolisme du DEHP

Le DEHP présente une certaine toxicité qui dépend de sa fraction absorbée et métabolisée.

- **Absorption :** Après administration par voie orale, le DEHP subit une hydrolyse en mono-2-ethylhexyle phtalate (MEHP) et en 2-ethylhexanol (2-EH) par des lipases au niveau du tractus gastro-intestinal. Le MEHP ainsi formé est absorbé par la muqueuse digestive et se retrouve dans le compartiment sanguin. Le 2-EH est éliminé directement après sa formation par le tractus digestif.

Le taux de métabolisation par la muqueuse digestive fait l'objet de données contradictoires. Les résultats publiés incitent à penser qu'entre 25% [6] et 50% [10] du DEHP ingéré est éliminé directement dans les fèces.

- **Distribution :**

- Après une administration par voie IV, le DEHP se lie en totalité aux protéines plasmatique avec une demi-vie de 18.6 heures.

- Le MEHP absorbé ou formé existe sous forme libre et sous forme liée aux protéines plasmatiques au niveau sanguin. Le MEHP libre diffuse rapidement dans les tissus (foie, poumons, testicules, ovaires, rein).

- **Métabolisme : (Figure 4)**

Au niveau sanguin, le DEHP, après une exposition IV subit une première métabolisation en MEHP par des estérases et des lipases sanguines.

Il existe une exposition directe particulière au MEHP qui a été décrite dans la littérature. Dans les poches de transfusion sanguine, il peut y avoir une transformation du DEHP libéré de

la poche par les estérases des globules rouges en MEHP. Ce qui conduit à une exposition directe à ce métabolite par voie IV.

Le MEHP produit ou absorbé subit ensuite une métabolisation oxydative hépatique par β -hydroxylation via les enzymes du cytochrome P450. Les principaux métabolites secondaires produits sont :

- Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyle) phtalate (**5OH-MEHP**)
- Mono(2-ethyl-5-carboxypentyle) phtalate (**5Cx-MEPP**)
- Mono(2-ethyl-5-oxohexyle) phtalate (**5oxo-MEHP**)
- Mono(2-(carboxyméthyl)hexyle) phtalate (**2Cx-MMHP**)

Ces secondaires sont enfin glucuronoconjugués au niveau rénal.

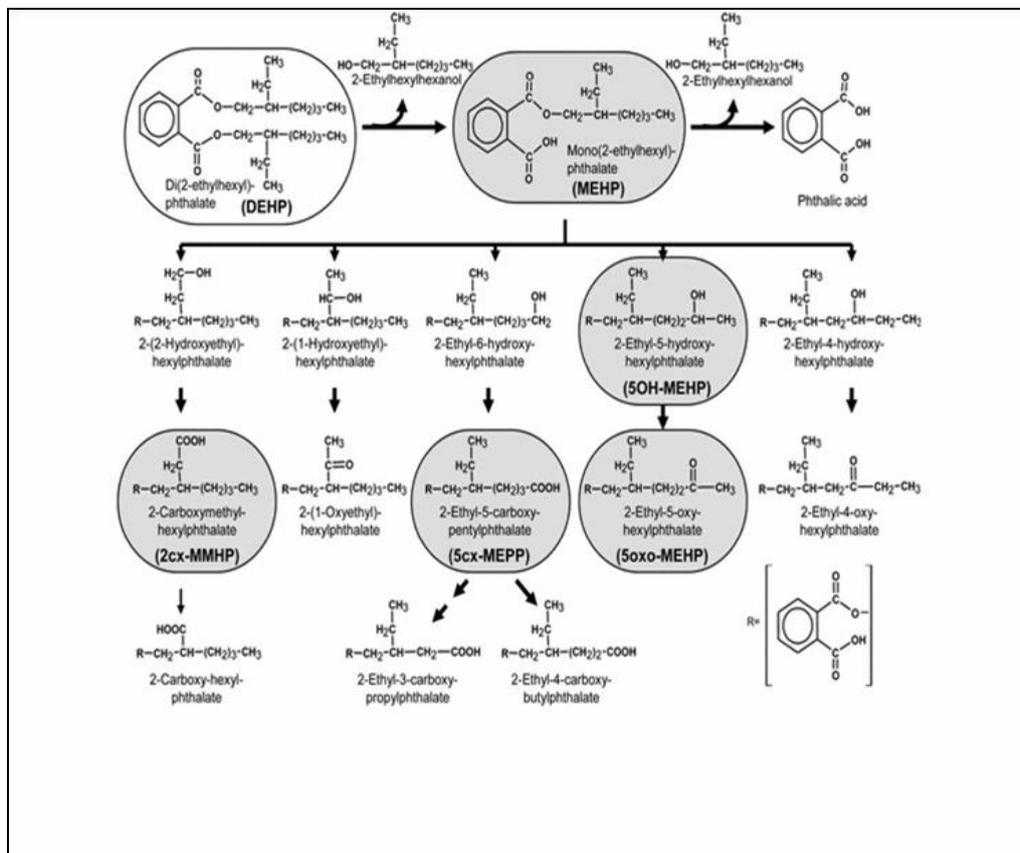


Figure 4 : Métabolisme du DEHP chez l'homme (d'après Koch JM et al. 2005) [11]

• Elimination :

Les produits du métabolisme du DEHP sont principalement éliminés par voie urinaire chez l'homme à 80% sous forme de glucuronides. Les nouveau-nés qui ne possèdent pas de

système de glucuronocojugaison mature sont plus sensibles aux effets toxiques du DEHP et de ses métabolites.

Ainsi, après une exposition par voie orale ou intraveineuse au DEHP, il est retrouvé majoritairement du 5OH-MEHP et du 5Cx-MEPP dans les urines. Ces composés constituent de fait des marqueurs de l'exposition au DEHP.

I.5 Toxicité

Chez les mammifères, les récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome Proliferators Activated Receptors) sont les cibles privilégiées des phtalates. Dans cette famille de récepteurs, les cibles principales sont les sous-unités PPAR α et γ . Au niveau ovarien, la fixation des phtalates sur ces récepteurs PPAR médit l'effet perturbateur endocrinien notamment l'inhibition ou la stimulation enzymatique de l'aromatase qui permet la transformation des hormones stéroïdienne en œstrogènes.

Les cibles des phtalates sont également les récepteurs aux Œstrogènes α et β (ER), les récepteurs des androgènes (AR), les récepteurs des xénobiotiques CAR (Constitutive Activated Receptor) et PXR (Pregnant X Receptor).

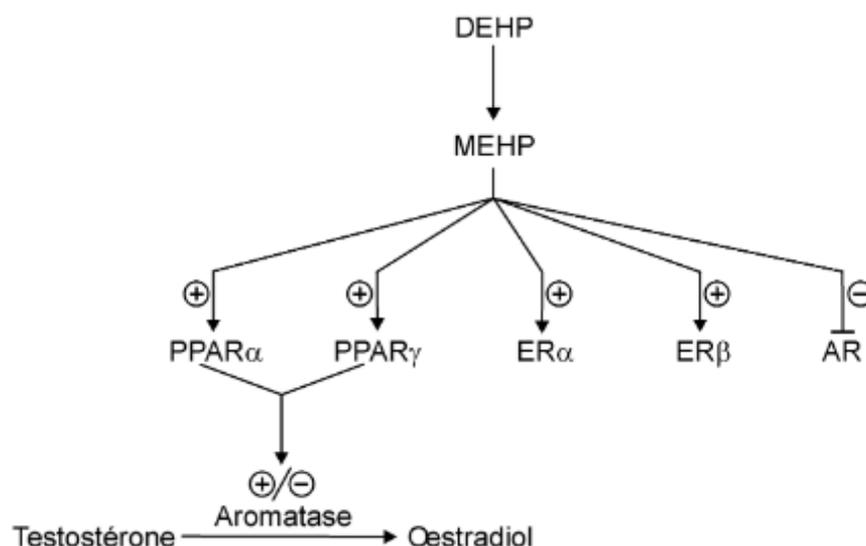


Figure 5: Récepteurs cibles des phtalates

Les études chez l'animal ont démontré une toxicité d'organes du DEHP et de ses principaux métabolites après sa fixation sur les récepteurs PPAR au niveau du rein, du foie et des organes sexuels. L'ensemble des effets organotoxiques décrit dans la littérature est regroupé dans le tableau 2.

Tableau 2 : Synthèse des données de toxicité chez l'animal.

ORGANES	EFFETS	ANIMAUX	DOSE/DUREE	REFERENCES
TESTICULES	Atrophie et dégénérescence tubulaire	Rats	0.9 – 1.9 g/Kg/Jr pdt 90 jrs Per os (P.O)	Shaffer et al. 1945 [12]
	Désorganisation de la structure des tubes séminifères chez les mâles de la portée	Rats N=36 portées 7 petits/portée	3 – 3.5 mg/Kg/jr J1 de gestation (G) – j21 après (P.O)	Arcadi et al. 1998 [13]
	Atrophie du testicule et du canal de l'épididyme Agénésie testiculaire Hémorragie testiculaire	Rats N = 69	750 mg/Kg/jr J14 G – J3 après G (P.O)	Grayet et al. 1999
∅ TESTICULAIRE <i>in vitro</i>	Détachement des cellules de Sertoli et des gonocytes	∅ testiculaire <i>in vitro</i>	27 µg/L MEHP dans le milieu de culture pdt 48h	Li et al. 1999 [14]
FOIE	Adénome hépatocellulaire	Rat N = 330	146.6 mg/Kg/jr pdt 104 semaines P.O	Moore et al. 1996 [15]
	Anomalie histologique	Singes Rhésus N = 12	87.5 – 290 mg sur 1an en IV Sg stocké ds un sac en PVC	Kevy et Jakobson 1982 [16]
	Réduction de la fonction du foie			
OVAIRES	Suppression ou retard d'ovulation Suppression de production d'estradiol	Rat N = 6-9 groupes 8 groupes	2 g/Kg/jr P.O pdt 3-12 jours	Davis et al. 1994 [17]
REINS	Réduction de la clairance de la créatinine	Rat N = 65	2 mg/Kg 3x/sem P.O pdt 1 an	Crocker et al. 1988 [18]
	Dégénération et atrophie des tubules rénaux	Souris N = 60	12 000 ppm P.O pdt 24 sem	Ward et al. 1998 [19]
FŒTUS	Mort fœtale, ouverture du tube neural, réduction de la taille des petits	Souris N = 80	1000 mg/Kg/jr P.O J8G-J9G pdt 2	Peters et al. 1997 [20]

Chez l'homme, le DEHP a été référencé comme perturbateur endocrinien, notamment par ses effets sur la fertilité et sur le développement des fœtus et des nouveau-nés [10].

I.6 Alternatives à l'utilisation du DEHP dans les DM en PVC plastifié

La toxicité prouvée et documentée du DEHP a semblé suffisante pour qu'il apparaisse nécessaire de limiter son utilisation dans les dispositifs médicaux. Plusieurs alternatives à l'utilisation de ce PVC plastifié ont été développées, à savoir :

- **La substitution du PVC par un autre polymère dans le DM :**

- Les polyoléfines (polyéthylène (PE) et polypropylène (PP)) et l'acétate d'éthyle de vinyle (EVA) : Pour les poches de concentrés globulaires, poches de nutrition [22,23].

- Les polyoléfines, le polyuréthane (PUR), L'EVA et le silicone : Pour les lignes de perfusion, cathéters [23,24].

Ces polymères permettent de supprimer le risque d'exposition au DEHP. Néanmoins, leurs propriétés mécaniques sont souvent inférieures à celles du PVC et leur mise en œuvre est plus difficile, nécessitant des coûts de production élevés. Pour ces raisons, leur utilisation est actuellement limitée dans la fabrication des DM.

- **Le traitement de surface du PVC plastifié pour limiter le relargage de DEHP :**

Le greffage moléculaire consistant à la surface du PVC plastifié de molécules de Polyéthylène glycol de bas poids moléculaire (PEG 400) [24] ou des molécules de polyazido acrylates [25] permettent une réduction du relargage du DEHP du PVC plastifié.

Cette alternative présente des avantages dans la mesure où elle permet de conserver toutes les propriétés mécaniques du PVC tout en réduisant le relargage du DEHP. Le traitement de surface nécessite des réactions de synthèse secondaires de longue durée et elle demeure difficilement applicable d'un point de vue industriel. De plus, peu d'études ont été réalisées sur le relargage des molécules de greffage dans des conditions d'utilisation clinique.

- **La substitution du DEHP par un autre plastifiant dans le PVC**

La substitution du DEHP par un autre plastifiant est une alternative envisageable lors de la fabrication du PVC. Les plastifiants sélectionnés doivent conférer des propriétés mécaniques au PVC comparables à celles conférées par le DEHP et surtout présenter une moindre toxicité.

La figure 6 représente le diagramme de gestion du risque associé à l'utilisation des dispositifs médicaux en PVC plastifié au DEHP. Suite au classement CMR du DEHP, le SCENIHR a ciblé des populations et des actes médicaux pour lesquels le risque d'exposition au DEHP est très élevé. Il a été émis des propositions de conduite à tenir en fonction de la population et de l'acte médical. Dans le but de sécuriser le patient au cours de l'acte médical et répondre aux exigences réglementaires liées à l'utilisation des plastifiants dans le DM en PVC, les industriels ont à leur disposition les trois alternatives à l'utilisation du DEHP précédemment citées. Quelque soit l'alternative choisie, l'absence de toxicité et la biocompatibilité des biomatériaux utilisés devra être vérifiée.

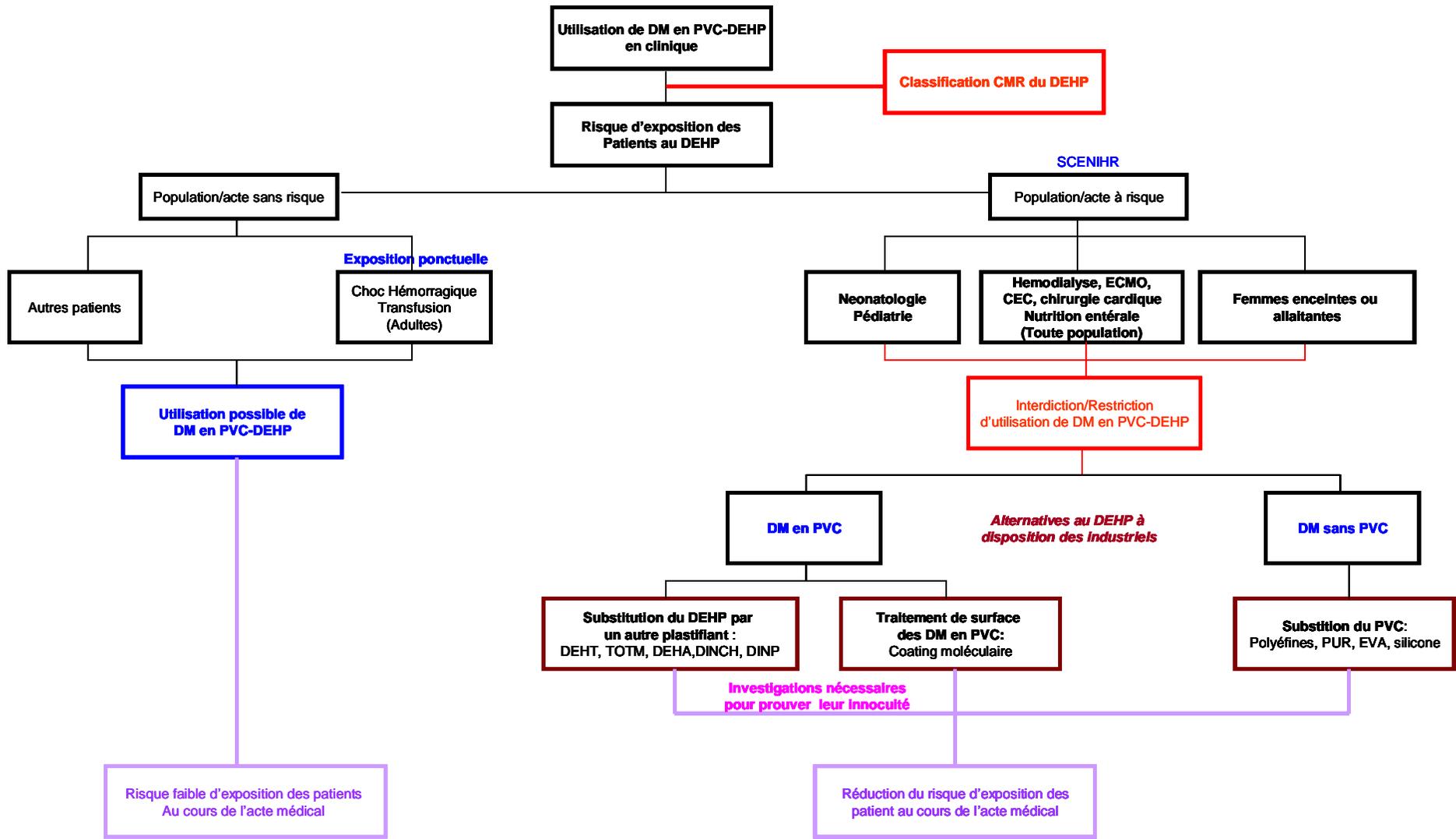


Figure 6 : Diagramme de gestion de risque associé à l'exposition aux DM en PVC-DEHP.

Les plastifiants sélectionnés comme substituant du DEHP et leurs principaux métabolites primaires sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Plastifiants alternatifs du DEHP et leurs principaux métabolites secondaires.

Plastifiants alternatifs	Métabolites primaires
DEHP <i>(Diethylhexyle phthalate)</i>	MEHP <i>(Monoethylhexyle phthalate)</i>
DEHT <i>(Diethylhexyle téréphthalate)</i>	MEHT <i>(Monoethylhexyle téréphthalate)</i>
DINP <i>(Diisononyle phthalate)</i>	MINP, MMeOP <i>(Mono-iso-nonyle phthalate, mono(4-methyloctyl)phthalate)</i>
DINCH <i>(diisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate)</i>	MINCH, MMeOCH <i>(monoisononylcyclohexane, mono(4-methyloctyl) cyclohexane-1,2-dicarboxylate)</i>
DEHA <i>(Diethylhexyle adipate)</i>	MEHA <i>(Monoethylhexyle adipate)</i>
TOTM <i>(Triocyltrimellitate)</i>	MOTM <i>(momooctyltrimellitate)</i>

Les différentes caractéristiques physico-chimiques et les données de toxicité obtenues chez l'homme et l'animal sont résumées dans le tableau 4 (d'après [26]). Pour ces composés, leur toxicité est exprimée en NOAEL (No observable adverse effect Level). La NOAEL ou dose maximale sans effet néfaste observable est une unité de valeur utilisée en toxicologie pour exprimer la toxicité d'une substance administrée. Sa détermination consiste à rechercher expérimentalement la réponse d'un organisme soumis à des concentrations (ou doses) croissantes de la substance à tester. Elle désigne la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est observé dans une gamme de concentrations bien précise par rapport aux témoins. Elle peut être utilisée comme valeur de comparaison de toxicité entre deux molécules différentes lorsqu'elle est déterminée dans les mêmes conditions expérimentales pour chaque molécule.

De la même façon, il est possible de déterminer la LOAEL (low observable adverse effect level) ou dose la plus faible produisant un effet néfaste et la CE50 (concentration efficace 50) ou dose pour laquelle 50% de l'effet max est observé. (figure 7)

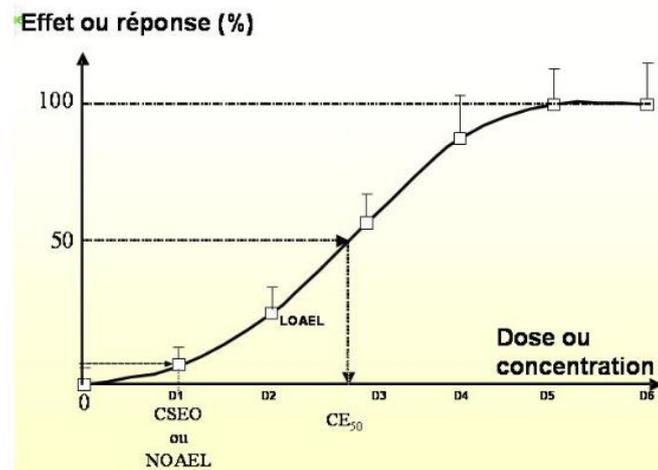


Figure 7 : courbe Effet-Dose exprimant la NOAEL d'une substance à tester.

Tableau 4 : Synthèse des données sur les plastifiants alternatifs au DEHP.

		DEHP	DEHT	DINP	DEHA	DINCH	TOTM
Propriétés Physico-chimiques	MM (g/mol)	390.6	390.6	420.6	370.57	424.6	546.8
	Point de Fusion (°C)	-50	-48	-40 à -54	-67.8	-54°C	-50
	Densité (g/mL)	0.986	0.986	0.970	0.925	0.947	0.99
	Point d'ébullition (°C)	385	363	424	214	240-250°C (4 hPa)	283
	Solubilité dans l'eau (mg/L)	0.003	0.0004	0.0006	0.78	<0.02 (25°C)	0.13
METABOLITES		MEHP, 2-EH, OH-MEHP, OXO-MEHP, CX-MEPP, CX-MMHP	2-EH, TPA, MEHT	MINP, OH-MINP, Oxo-MINP, Cx-MINP	MEHA, 2-EH, AA	Mono-isononyl ester, A. CHdicarboxilique	MOTM, DOTM
TOXICITE	ANIMAUX	Reprotoxique, Embryotoxique, Foetotoxique, Tératogène *NOAEL = 4.8 mg/kg/jr	Foetotoxique *NOAEL = 79 mg/kg/jr	Reprotoxique, Carcinogène *NOAEL=15 mg/Kg/jr	Foetotoxicité, Toxicité sur le développement *NOAEL=200 mg/kg/jr	Toxicité rénale *NOAEL= 107 mg/kg/jr	Foetotoxique *NOAEL = 100 mg/kg/jr
	HOMME	REPROTOXIQUE	Pas de données	Pas de données	Pas de données	Pas de données	Pas de données

I.6 Biocompatibilité des dispositifs médicaux

Les biomatériaux utilisés pour la fabrication de DM entrent en contact direct ou indirect avec l'environnement biologique du patient. Ces contacts peuvent entraîner des interactions physiques, chimiques ou encore biologiques réciproques entre le DM et l'hôte. Les réactions sont immédiates, à moyen ou à long terme. Les interactions DM/Hôte dépendent de la nature des biomatériaux qui constituent le DM et des conditions d'utilisation de ce dernier. En principe, l'utilisation des dispositifs médicaux dans l'organisme ne doit pas entraîner l'altération de l'environnement biologique et l'environnement biologique ne doit pas altérer le DM d'où la notion de biocompatibilité des DM.

La biocompatibilité d'un matériau se définit comme la capacité à provoquer une réponse appropriée de l'organisme hôte dans une application bien définie. La nature des interactions, locales ou systémiques et l'indication d'utilisation du DM détermine les critères d'évaluation de la biocompatibilité des biomatériaux constituant un DM.

Le référentiel utilisé pour le marquage CE est la norme NF EN ISO 10 993 qui liste les exigences auxquelles doivent répondre les DM avant leur mise sur le marché.

La norme NF EN ISO 10 993 est constituée de 20 parties. La partie 1 (norme NF EN ISO 10 993-1) correspond à la base de la présente norme. Elle décrit :

- Les principes généraux sur lesquels repose l'évaluation biologique des DM dans un processus de gestion des risques,
- La classification générale des DM, fondée sur la nature et la durée de leur contact avec le corps humain,
- L'évaluation de toutes les données existantes,
- L'identification de manques dans les ensembles de données disponibles sur la base d'une analyse de risque,
- L'identification d'ensembles de données supplémentaires nécessaires à l'analyse de la sécurité biologique du DM, et
- L'évaluation de la sécurité biologique du dispositif médical.

La norme NF EN ISO 10993-5 décrit les essais de cytotoxicité *in vitro* lors de l'évaluation biologique des DM.

Pour la réalisation des différents essais de cytotoxicité, la norme recommande l'utilisation de lignées cellulaires établies (cellules de fibroblastes cutanés murins L929, cellules épithéliales de rein de singe VERO CCL81, cellules de fibroblastes pulmonaire humains CCL 171). L'avantage d'utiliser ce type cellulaire est la possibilité d'étudier les interactions spécifiques à l'échelle cellulaire et moléculaire et enfin la répétabilité des tests.

La norme définit trois catégories de tests potentiels à réaliser pour évaluer la cytotoxicité d'un biomatériau :

- **Les tests par contact direct** : ils consistent à cultiver les cellules au contact du biomatériau à évaluer.

- **Les tests par contact indirect** : ils consistent à cultiver les cellules en présence du biomatériau à tester à travers une interface constituée d'un gel d'Agar ou d'un filtre.

- **Les tests à partir d'extraits** : ce type de test consiste à cultiver les cellules au contact d'un extrait du biomatériau à évaluer. Il permet l'étude de la cytotoxicité de substances potentiellement relargables du DM. La réalisation des extraits du biomatériau se fait par la mise en contact du biomatériau avec une solution d'extraction (eau, milieu de culture, chlorure de sodium, huile végétale ou du diméthyle sulfoxyde (DMSO)) pendant un temps défini (maximum 72h) à une température donnée.

L'évaluation de la cytotoxicité du biomatériau se fait selon une échelle qualitative par observation microscopique et estimation d'une échelle de cytotoxicité en fonction des dégâts cellulaires éventuellement causés par le biomatériau ; ou une échelle quantitative par la mesure des paramètres de prolifération cellulaire, de chimiotactisme ou encore de sécrétion.

L'évaluation quantitative de la cytotoxicité d'un matériau est de plus en plus réalisée en utilisant le MTT test (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). Ce test permet d'estimer la viabilité cellulaire après contact d'un agent cytotoxique.

Le principe du MTT test repose sur la faculté de clivage du sel de tétrazolium (réactif MTT) par les déshydrogénases mitochondriales des cellules viables. Ainsi, le contact réactif MTT / cellule entraîne la formation d'un précipité pourpre de cristaux de formazan qui est

solubilisable par du DMSO. La mesure de la densité optique par spectrophotométrie de la solution résiduelle permet d'estimer le pourcentage de viabilité cellulaire.

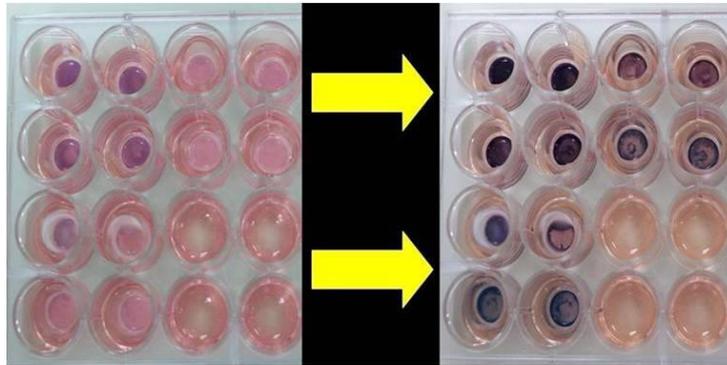


Figure 8 : MTT test. Formation de cristaux de formazan.

II MATERIELS ET METHODES

L'évaluation de la cytotoxicité des plastifiants a été réalisée en conformité à la norme européenne **EN NF ISO 10 993-5**.

Les tests sur les plastifiants alternatifs et leurs principaux métabolites primaires ont été réalisés à l'état pur. Pour se faire, nous avons procédé selon la méthodologie suivante :

Matériels :

- Plastifiants purs testés (SIGMA-ALDRICH France) (Tableau 5)

[Tableau 5 : Plastifiants alternatifs au DEHP.](#)

PLASTIFIANTS	N° CAS (Chemical Abstract Service)
DEHT	6422-86-2
DINP	68515-48-0
DEHA	103-23-1
TOTM	3319-31-1
DINCH (BASF)	474919-59-0

- Métabolites primaires synthétisés par l'Unité INSERM U990 de Clermont-Ferrand, partenaire du projet ARMED.
- Diméthyle sulfoxyde (DMSO) (SIGMA-ALDRICH FRANCE, N°CAS: 67-68-5)
- Dubelco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies SAS)
- Sérum de veau foetal (SVF) (Life Technologies SAS)
- Pénicilline / Streptomycine (P/S) (Life Technologies SAS)
- Tubes polypropylène 15 mL (Corning BV Life Sciences)
- Spectrophotomètre (VICTOR™ Multilabel HTS Counter PerkinElmer).
- Lignée cellulaire L929 (SIGMA-ALDRICH France, lot : 10L019)
- Actinomycine D (SIGMA-ALDRICH FRANCE, lot : 102M4009V, N° CAS : 50-76-0)
Réactif MTT test (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) (SIGMA-ALDRICH FRANCE, lot : MKBL6157V, N°CAS : 298-93-1).
- Plaques 96 puits (Corning BV Life Sciences)

Méthodes :

II.1 Synthèse des métabolites

Les métabolites primaires des plastifiants ont été synthétisés pour la première fois par l'Unité INSERM U990 de Clermont-Ferrand, partenaire du projet ARMED.

II.2 Solubilisation des plastifiants

Tous les plastifiants alternatifs et leurs métabolites ont été solubilisés à une concentration de 1% (10mg/mL) dans du DMSO (Solutions mères). Les concentrations des solutions mères à 1% ont été dosées par Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS).

Ces solutions mères ont ensuite été diluées dans du milieu de culture complet (DMEM + 10% de SVF + 1% de P/S) à différents pourcentages :

- **0.1 %** soit **0.01 mg/mL** en plastifiant (99.8 % de DMEM, **0.1 %** de DMSO et **0.1 %** de plastifiant)
- **0.5 %** soit **0.05 mg/mL** en plastifiant (99 % de DMEM, **0.5 %** de DMSO et **0.5 %** de plastifiant)
- **1 %** soit **0.1 mg/mL** en plastifiant (98 % de DMEM, **1 %** de DMSO et **1 %** de plastifiant)

II.3 Culture cellulaire

Les cellules L929 ont étéensemencées et cultivées dans des plaques multipuits 96 (sans plastifiants) avec du DMEM complet (10% SVF, 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine) à 37°C sous 5% de CO₂.

II.4 Estimation de la viabilité cellulaire : Test MTT

Procédure :

Le réactif MTT a été utilisé à la concentration de 5 mg/mL dans du PBS. A la fin de la culture cellulaire, les milieux de cultures ont été retirés et 30 µL du réactif MTT ont été introduites dans chaque puits. Les cellules ont été incubées pendant 3 h à 37°C sous 5% de CO₂. Le réactif MTT a ensuite été retiré et 200 µL de dimethylsulfoxyde ont été introduites dans chaque puits. Après 1h de dissolution des cristaux de formazan, la densité optique (DO) de chaque puits a été mesurée à 570 nm (spectrophotometer VICTOR™ Multilabel HTS Counter PerkinElmer).

II.5 Spécificité et linéarité du Test MTT

Spécificité

Une comparaison sur 5 jours entre une culture cellulaire avec du milieu complet et une culture cellulaire avec du milieu complet supplémenté par 0.1% d'actinomycine D (inducteur d'apoptose [27]) a été effectuée.

10⁴ cellules L929 ont étéensemencées en triplicat avec du milieu complet dans des plaques 96 puits pour chaque condition et chaque jour (J-1). 24h après l'ensemencement, le milieu de culture des puits a été éliminé par aspiration et le renouvellement de milieu s'est fait avec du milieu complet ou du milieu complet supplémenté par l'actinomycine D (J0). Un changement de milieu a été effectué tous les jours. 48h après l'ensemencement, un MTT test a été réalisé tous les jours (J1-J5) selon la méthode décrite précédemment.

Les densités optiques (DO) mesurées ont permis d'estimer les pourcentages de viabilités spécifiques quotidiennes des cellules de la condition test par rapport au contrôle, selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de viabilité spécifique} = [(A - B)/(C - B)] \times 100$$

A = Densité optique du TEST (Puits avec cellules + milieu complet + 0.1% d'actinomycine D)

B = Densité optique du blanc (Puits sans cellules + milieu complet)

C = Densité optique du Contrôle (Puits avec cellules + milieu complet)

Linéarité

Les cellules L929 ont étéensemencées en triplicat à des densités cellulaires croissantes par puits (5×10^3 – 10×10^3 – 50×10^3 – 100×10^3 – 150×10^3 – 200×10^3 – 250×10^3 – 300×10^3 – 350×10^3) dans des plaques 96 puits. Après 8h d'adhérence, le test MTT a été réalisé selon la procédure décrite précédemment.

II.6 TESTS DE BIOCOMPATIBILITE

II.6.a Tests de viabilité du DMSO

Une estimation du pourcentage limite de toxicité du DMSO sur une culture cellulaire a été réalisée. 10^4 cellules L929 par puits ont étéensemencées en triplicat dans des plaques 96 puits (J-1). Les plaques ont ensuite été placées dans un incubateur. Après 24h d'adhésion, le milieu de culture a été éliminé par aspiration. Les pourcentages de DMSO testés dilués dans du milieu complet ont été 0.1 % ; 0.5 % ; 1 % ; 2.5 % et 5 % (J0). Un changement de milieu a été effectué tous les jours. 48h après l'ensemencement, le MTT test a été réalisé tous les jours suivi d'une lecture spectrophotométrique (J1-J7).

II.6.b Tests de viabilité des plastifiants alternatifs et leurs métabolites

Pour tester la cytotoxicité des plastifiants et des métabolites, les cellules L929 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 10^4 cellules par puits. Elles ont ensuite été placées dans un incubateur pendant 24 h pour permettre l'adhésion des cellules au fond des puits. Le milieu de culture des différents puits a été éliminé par aspiration et les différentes conditions expérimentales ont été réalisées ; à savoir :

- **Un contrôle positif** : triplicat de cellules cultivé dans du milieu complet (C).
- **Un contrôle DMSO** : triplicat de cellules cultivé dans du milieu complet supplémenté par un pourcentage de DMSO (0.1%, 0.5% et 1%) (A).
- **Un test** : triplicat de cellules cultivé dans une dilution de la solution M à 1% de plastifiants dans du milieu complet (0.1%, 0.5% et 1%) (A).

- **Un blanc** : triplicat dépourvu de cellules contenant uniquement du milieu complet (B).

L'évaluation s'est déroulée sur 7 jours pour chaque plastifiant et métabolite avec changement de milieu tous les jours. Le plan d'expérimentation est résumé sur la figure 14.

Le MTT test suivi d'une lecture spectrophotométrique a été réalisé chaque jour 24h après la réalisation des différentes conditions expérimentales (J1-J7). Les différents pourcentages de viabilités spécifiques (contrôle DMSO et test) par rapport au contrôle positif de prolifération cellulaire ont été estimés.

$$\text{Pourcentage de viabilité spécifique} = \frac{[(A - B)/(C - B)] \times 100$$

A = Densité optique contrôle DMSO (puits avec cellules + milieu complet + % DMSO)

ou du TEST (puits avec cellules + milieu complet + % DMSO + % de plastifiants)

B = Densité optique du blanc (puits sans cellules + milieu complet)

C = Densité optique du Contrôle (puits avec cellules + milieu complet)

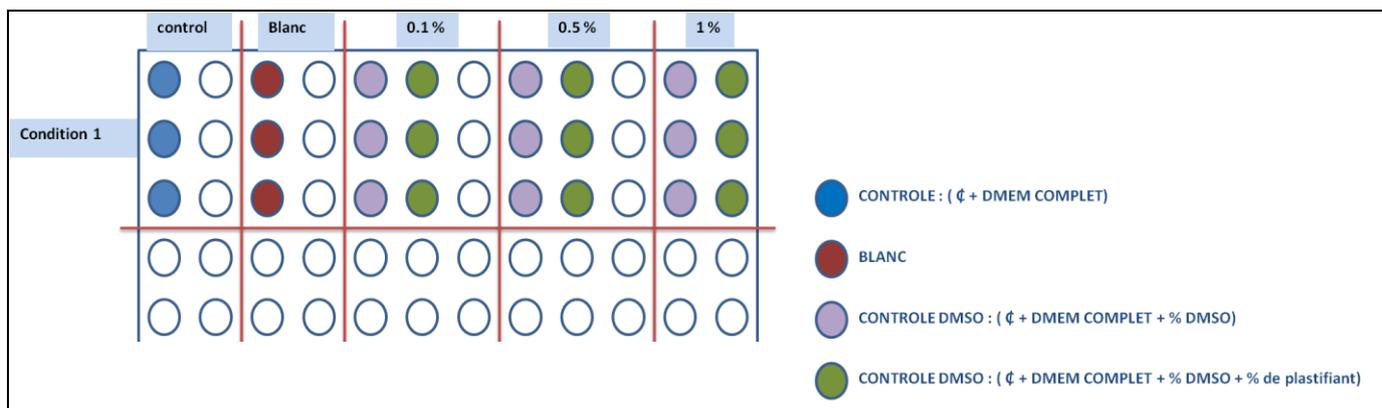


Figure 9: Plan de plaque par jour (J1-J7).

II.4 Analyse statistique

Une analyse statistique par un test non paramétrique de MANN-WHITNEY a été réalisée pour la comparaison des différents résultats, un niveau de risque de 5% a été retenu.

III RESULTATS

III.1 Synthèse des métabolites primaires des plastifiants

La figure 10 représente un résumé des formules chimiques des différents métabolites primaires synthétisés pas l'UMR 990 de Clermont-Ferrand. Ces différents métabolites primaires ont été obtenus soit à partir de l'acide phtalique, soit à partir d'un autre composé de synthèse. Les molécules obtenues à la fin des étapes de synthèse ont été conformes et pures.

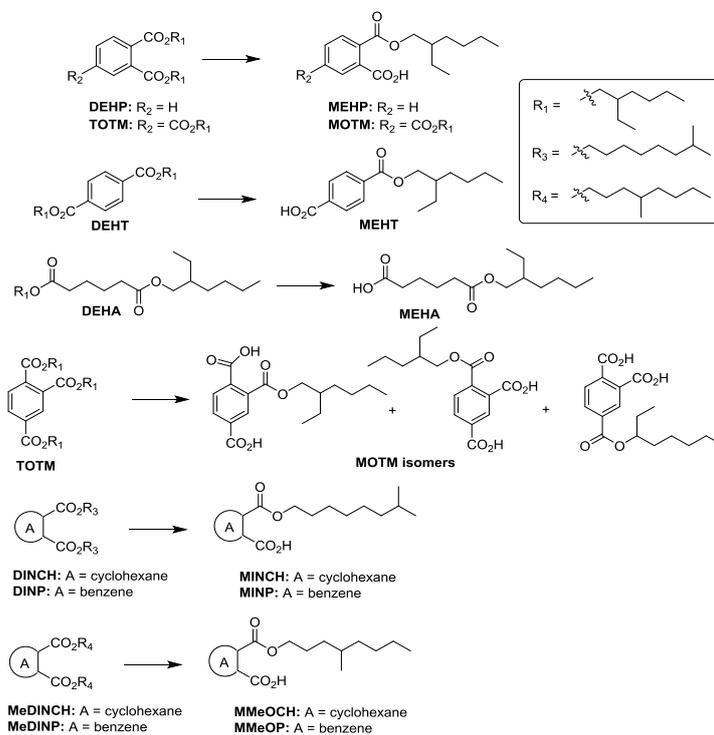


Figure 10 : Métabolites primaires synthétisés des plastifiants alternatifs

III.2 Solubilisation des plastifiants

Des essais de solubilisation des plastifiants préalables à la réalisation des solutions mères de plastifiants ont été effectués dans le but de déterminer leur limite de solubilité dans le DMSO.

Des solutions homogènes ont été obtenues lors de la réalisation de dilution à 1% de plastifiants. Lorsque les concentrations en plastifiants augmentent, il se forme un mélange non miscible dans lequel la phase plastifiant et celle DMSO sont distinctes. La figure 8 représente la

différence de solubilité des plastifiants entre une solution à 1% et une autre à 10% de plastifiants dans du DMSO. La différence de phase a été mise en évidence par l'ajout de bleu trypan dans le DMSO (**Figure 11**).

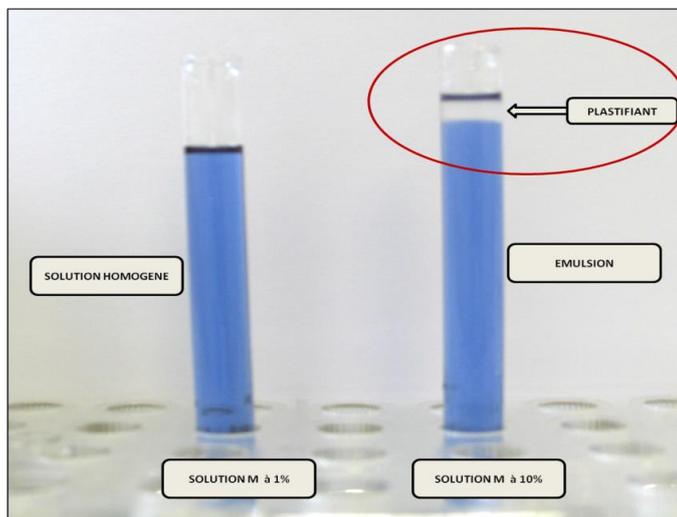


Figure 11 : Limite de solubilité des plastifiants dans du DMSO coloré au bleu trypan.

Les résultats des dosages par GC/MS (Tableau 6) des solutions mères à 1% de plastifiants dans le DMSO ainsi réalisées sont résumés dans le tableau. Nous pouvons observer que les valeurs mesurées dans les solutions préparées sont très peu différentes des concentrations cibles.

Tableau 6 : Résultats dosages des solutions mères de plastifiants par GC/MS. (n=3)

Echantillons	Moyenne des C° cibles (mg/mL)	Moyenne des C° mesurées (mg/mL)	Ecart-type	CV
DINP	10	9,97	1,16	1,16%
DEHP	10	11,32	0,21	1,86%
TOTM	10	10,53	0,42	4,03%
DEHT	10	9,07	0,29	3,20%
DEHA	10	10,17	0,18	1,76%
DINCH	10	8,54	0,14	1,64%

III.3 Spécificité et linéarité du test MTT

Spécificité

Le contrôle de mort cellulaire a été réalisé afin de déterminer la spécificité du MTT test à détecter les cellules viables. Ce contrôle met en évidence :

Une différence significative entre la densité optique du contrôle et celle du test de J1 à J5. En effet, dans la condition contrôle, la densité optique augmente progressivement et significativement de J1 à J5. A l'inverse, la densité optique des puits où l'apoptose a été induite par l'actinomycine D diminue significativement de J1 jusqu'à devenir nulle à J5. (Figure 12a)

Une diminution significative de la viabilité cellulaire dans la condition Actinomycine D de J1 à J3 qui s'annule à partir de J4. (Figure 12b)

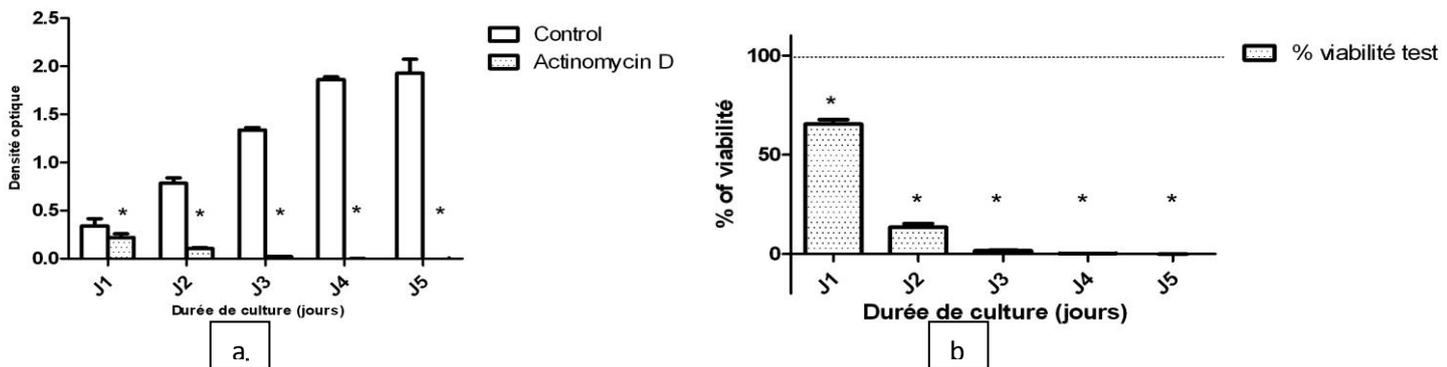


Figure 12 : Contrôle positif de mort cellulaire par l'Actinomycine D. a) En bleu, densité optique des puits contrôle de J1-J5. En rouge, densité optique des puits traités par l'actinomycine D de J1-J5. b) Pourcentage de viabilité spécifique des cellules traitées par l'actinomycine D par rapport au contrôle de J1-J5. * $p < 0.05$ Actinomycine D vs contrôle.

Linéarité

La linéarité du test MTT a été établie. Il est observé une augmentation proportionnelle de la densité optique en fonction de l'augmentation du nombre de cellules dans les puits. (figure 13)

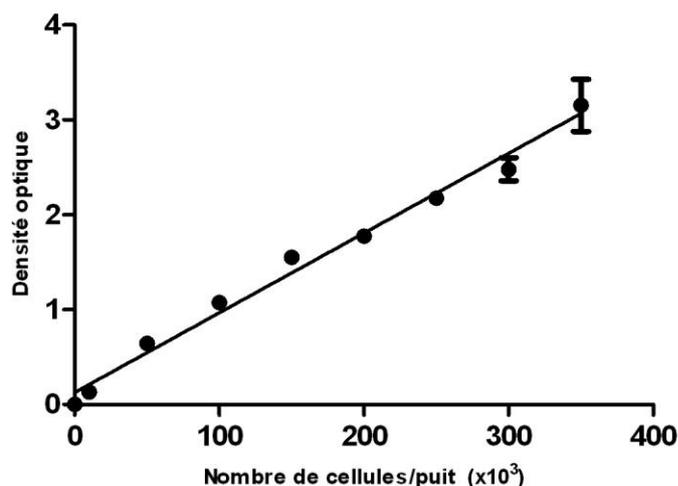


Figure 13 : Linéarité du test MTT. Il est observé une augmentation proportionnelle de la densité optique en fonction de l'augmentation du nombre de cellules dans les puits.

III.4 Test de cytotoxicité

III.4.a Test de cytotoxicité du DMSO

L'addition du DMSO dans le milieu de culture aboutit à une inhibition significative de la prolifération cellulaire dès J1 jusqu'à J7 pour les concentrations en DMSO de 1 à 5% dans le milieu complet. Cette inhibition est aussi observée à partir de J4 pour les concentrations inférieures à 1% mais les résultats ne sont pas significatifs (**Figure 14**).

La concentration de 1% de DMSO dans le milieu complet ne provoque jamais une inhibition de la prolifération cellulaire et n'empêche pas la prolifération cellulaire.

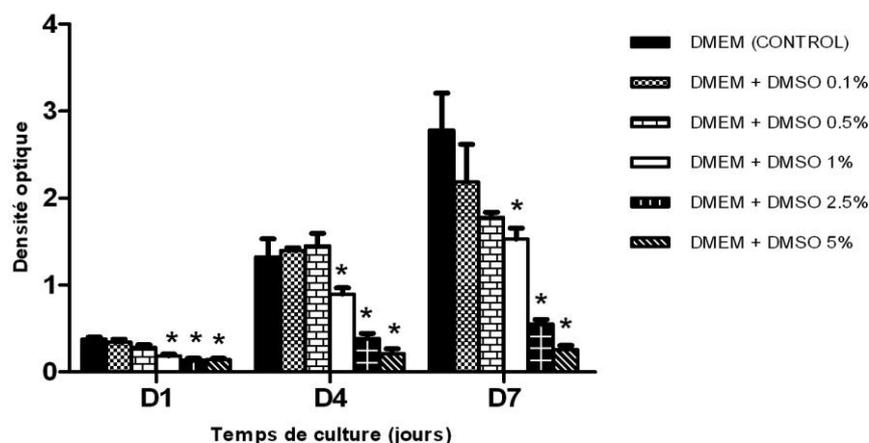


Figure 14 : Densités optiques des conditions contrôle et traitées par un pourcentage croissant de DMSO (0.1%, 0.5%, 1%, 2.5% et 5%) à J1, J4 et J5. *p < 0.05 cellules traitées par un % en DMSO vs condition contrôle.

III.4.b Test de cytotoxicité des plastifiants

Les conditions expérimentales de J1 à J7 ont été :

Un contrôle constitué d'une culture cellulaire dans du milieu complet.

Un contrôle DMSO constitué d'une culture cellulaire en présence d'un pourcentage de DMSO : 0.1%, 0.5% et 1% dilué dans du milieu complet.

Un test constitué d'une culture cellulaire en présence d'un pourcentage de DMSO : 0.1%, 0.5% et 1% et d'une concentration respective en plastifiants : 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL et 0.1 mg/mL ; l'ensemble dilué dans du milieu complet.

Les cellules ont été cultivées avec un changement de milieu de culture quotidien de J1 à J7.

Le pourcentage de viabilité spécifique du contrôle a été fixé à 100 % sur les 7 jours d'expérimentation. Sa représentation graphique correspond un trait horizontal à 100% de viabilité cellulaire.

La **figure 15** montre les résultats des tests de viabilité, au jour 7 (**J7**), réalisés sur des cultures de cellules L929 en présence de trois concentrations de plastifiants, après 7 jours de contact. Ce résultat de viabilité cellulaire au jour 7 de nos expérimentations est représentatif de ceux obtenus sur les 7 jours de culture :

Concentration en plastifiants de 0.01 mg/mL (figure 15a) :

Aucun des plastifiants ne présente un effet toxique sur les cellules par rapport au témoin contenant du DMSO à la même concentration.

Concentration en plastifiants de 0.05 mg/mL (figure 15b) :

Une diminution de la viabilité des cellules a été observée pour le **DEHP** et le **DINCH** à partir de cette concentration. Pour ces deux plastifiants, cette diminution de la viabilité est supérieure à 50 %.

Concentration en plastifiants de 0.1 mg/mL (figure 15c) :

Le **DINP** réduit de façon significative la prolifération des cellules à partir de cette concentration (40 %). Le **DEHP** et le **DINCH** quant à eux réduisent la viabilité cellulaire en dessous de 20%.

Pour les autres plastifiants (**TOTM**, **DEHA** et **DEHT**), il n'y a pas de différences significatives par rapport au contrôle DMSO quelle que soit la concentration testée.

L'ensemble des résultats des tests de viabilité des différents plastifiants, sur les 7 jours de culture, aux trois concentrations testées, est représenté en annexe partie 1.

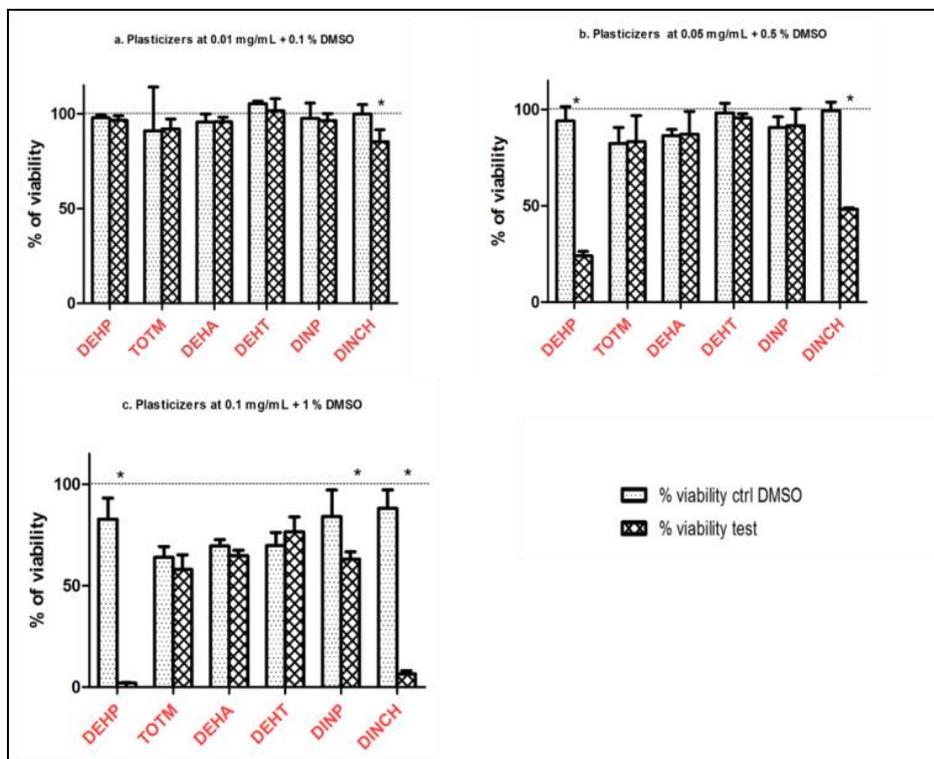


Figure 15: Test de cytotoxicité des plastifiants à 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) à J7. Résultats de viabilité cellulaire obtenus par le test MTT. Les cellules L929 ont étéensemencées à 104 cellules/puits et cultivées pendant 7 jours sous 3 conditions avec un changement quotidien de milieu de culture : un contrôle (milieu complet), un contrôle DMSO (milieu complet supplémenté par du DMSO à 0.1%, 0.5% et 1%) et un test (Solutions filles de plastifiants diluées dans du milieu de culture complet à 0.1% (0.01 mg/mL), 0.5% (0.05 mg/mL) et 1% (0.1 mg/mL). Le test MTT et l'estimation de la viabilité cellulaire ont été effectués tous les jours.

La figure 16 illustre les résultats des tests de viabilité des métabolites primaires des plastifiants.

Concentration en métabolites primaires de 0.01 mg/mL (figure 16a) :

A cette concentration, seul le **MEHP** réduit de façon significative la viabilité cellulaire par rapport au contrôle DMSO (70%). Les autres métabolites primaires ne provoquent pas de différence significative entre le test et le contrôle DMSO.

Concentration en métabolites primaires de 0.05 mg/mL (figure 16b) :

La viabilité cellulaire des cellules mises au contact du **MEHP** décroît de 70% (0.01 mg/mL) à environ 50% à cette concentration. De même, le **MEHT** et le **MINCH** provoquent une diminution significative de la viabilité cellulaire (environ 50%). Le **MeMOCH**, analogue structural du **MINCH** provoque quant à lui une diminution de 30% de la viabilité cellulaire. La viabilité cellulaire dans les puits contenant le **MEHA** ou le **MINP** est d'environ 80%. Le **MeMOP** analogue structural du **MINP** et le **MOTM** ne provoquent pas de diminution significative de la viabilité cellulaire.

Concentration en métabolites primaires de 0.1 mg/mL (figure 16c) :

A cette concentration, le **MEHT** et le **MINCH** sont beaucoup plus cytotoxiques que le **MEHP** (98 et 99% mort cellulaire observée respectivement, contre 70% de mort cellulaire observée pour le **MEHP**). L'effet du **MMeOCH** sur la viabilité cellulaire, est à peu près similaire à celui observés pour le **MINCH** à 0,1 mg / ml. Le **MMeOP**, un isomère structural de **MINP** et le **MOTM** ne diminuent jamais de façon significative la viabilité des cellules quelle que soit la concentration testée. Le **MEHA** est faiblement cytotoxique, la diminution de la viabilité cellulaire est d'environ 30%.

L'ensemble des résultats des tests de viabilité des différents métabolites primaires, sur les 7 jours de culture, aux trois concentrations testées, est représenté en annexe partie 2.

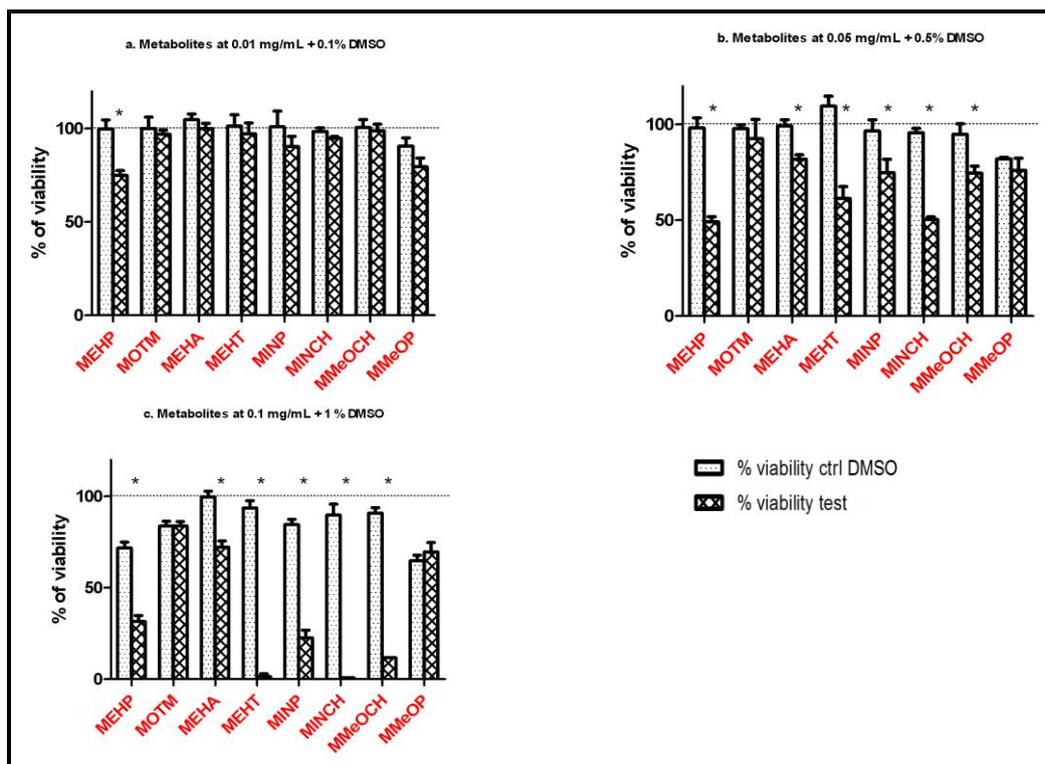


Figure 16: Test de cytotoxicité des métabolites primaires à 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) à J7. Résultats de viabilité cellulaire obtenus par le test MTT. Les cellules L929 ont été ensemencées à 104 cellules/puits et cultivées pendant 7 jours sous 3 conditions avec un changement quotidien de milieu de culture : un contrôle (milieu complet), un contrôle DMSO (milieu complet supplémenté par du DMSO à 0.1%, 0.5% et 1%) et un test (Solutions filles de métabolites primaires diluées dans du milieu de culture complet à 0.1% (0.01 mg/mL), 0.5% (0.05 mg/mL) et 1% (0.1 mg/mL)). Le test MTT et l'estimation de la viabilité cellulaire ont été effectués tous les jours.

En résumé, nous avons observé que le **MOTM** et le **MMeOP** ne sont pas cytotoxiques quelles que soient les concentrations testées. Le **MEHA** est faiblement cytotoxique. Le **MEHP**, **MEHT**, **MINP**, **MINCH** et **MMeOCH** sont cytotoxiques avec un effet de concentration.

IV DISCUSSION

De part de sa biocompatibilité, ses performances mécaniques, sa facilité de mise en œuvre, sa compatibilité médicamenteuse, sa disponibilité, son aptitude à la stérilisation et enfin son prix, le PVC est un biomatériau de choix pour la fabrication des DM. La possibilité d'y ajouter des adjuvants tels que les plastifiants permet d'optimiser ses performances mécaniques. Les phtalates sont les plastifiants les plus utilisés dans la fabrication des PVC. En effet, ils leur confèrent d'excellentes propriétés mécaniques telles que la souplesse et la plasticité adaptées aux DM pour leurs applications cliniques. Ainsi, le PVC associé aux phtalates est utilisé dans la fabrication d'un grand nombre de dispositifs médicaux entrant en contact direct ou indirect avec le patient. Le phtalate le plus utilisé pour la fabrication du PVC plastifié est le DEHP. Il a été démontré que dans certaines conditions, le DEHP est libéré du contenant vers les solutions stockées ou véhiculées par le DM en PVC plastifié au DEHP. Les patients sont ainsi exposés au DEHP certains actes médicaux.

Des études portant sur les phtalates sont menées depuis de nombreuses années [22]. En effet, au début des années 1980, le DEHP était le plastifiant le plus utilisé pour la fabrication des tétines et des jouets pour les enfants. Face à un effet carcinogène démontré chez les rongeurs suite aux investigations du NTP (National Toxicology Program) en 1982, les fabricants de jouets ont limité la quantité de DEHP à 3% (m/m) dans la confection des jouets en PVC souple destinés aux enfants de moins de 3 ans. Suite à cette restriction d'utilisation du DEHP, le DINP a pris une part considérable d'utilisation dans la fabrication jouets pour les enfants. Les premières réelles interrogations sur les effets des phtalates sur la santé ont été évoquées par les autorités danoises en 1997 [23]. En effet, suite à des investigations menées sur des anneaux de dentitions en PVC plastifié, la quantité de DINP relarguée a été jugée inacceptable. Face à cette alerte, plusieurs pays de l'Union Européenne dont la France ont entrepris de limiter la vente des produits pour enfants contenant des phtalates. Ce risque pour la santé des jeunes enfants du DINP a été confirmé par une étude dirigée par GEENPEACE en 1997 dans la mesure où plusieurs produits pour enfants contenaient 40 à 50% (m/m) de DINP. En 1998, l'Union Européenne a évoqué son intention de supprimer ou de contrôler la vente de produits et jouets pour enfants en PVC plastifié par des phtalates. Le DINP est resté autorisé pour la fabrication des tétines, des anneaux de dentition et des

jouets destinés aux enfants de moins de 36 mois si le taux de migration n'excédait pas 1.2 mg/10 cm² en 3h [24]. Enfin, les études estimant le niveau de risque d'exposition au DINP ayant migré des tétines et des jouets pour enfants durant la succion et l'évaluation de ce risque menées depuis 1999, ont conduit l'Union Européenne à interdire l'utilisation des phtalates comme plastifiants des jouets et des produits destinés aux enfants de moins de 3 ans en Septembre 2004. Le DEHP demeurant autorisé pour la fabrication des DM en PVC.

De nombreuses études chez l'animal ont démontré la toxicité d'organe du DEHP (rein, foie et organes sexuels) et son effet perturbateur endocrinien ; Le DEHP a été classé **reprotoxique de classe 1B** pour l'espèce humaine selon la classification des substances cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques (**CMR**) en accord avec la nouvelle réglementation CLP (« Classification, Labelling and packaging » des substances potentiellement toxiques) [2]. La directive européenne 2007/47/CEE [1] a renforcé les exigences sur l'utilisation des phtalates dans les DM en PVC.

Des alternatives à l'utilisation du PVC plastifié au DEHP ont été proposées, à savoir :

- la substitution du PVC par un autre polymère dans le DM (PP, PE, EVA, PUR, silicone).
- le traitement de surface du PVC plastifié pour limiter le relargage de DEHP (greffage de molécules de PEG 400 ou de polymères azido à la surface du PVC).
- la substitution du DEHP par un autre plastifiant dans le PVC.

Dans le but d'évaluer la substitution du DEHP par un autre plastifiant dans le PVC, un projet d'évaluation et de gestion des risques liés aux DM en PVC plastifié, **ARMED** (Assessment and Risk Management of Medical Devices in plasticized polyvinylchloride), a été initié. Dans ce projet, notre objectif étant de tester la cytotoxicité des plastifiants alternatifs au DEHP et leurs métabolites primaires en amont de leur utilisation selon la norme EN NF 10993. Cette étude constitue une première étape de screening de la toxicité *in vitro* des plastifiants alternatifs au DEHP et leurs métabolites primaires sur les fibroblastes murins L929 recommandés par la norme.

Les plastifiants alternatifs sélectionnés sont des molécules de haut poids moléculaire à savoir, le TOTM, le DEHA, le DEHT, le DINP et DINCH. Dans la littérature, des études portant sur la toxicité de ces plastifiants sont décrites à l'exception du TOTM. Pour le DEHA, il a été observé des propriétés cancérigènes ou une perturbation du cycle oestrogénique chez des souris femelle d'une part. D'autre part, une atrophie du follicule ovarien a été documentée chez des rats [28]. Concernant le DEHT, il n'a pas été décrit d'effets sur les organes reproducteurs, les reins, les hépatocytes et les peroxysomes qui sont des cibles connus du DEHP [29,30]. Le DINP et le DINCH ont été plus étudiés. Le niveau d'exposition au DINP est bien en dessous des NOAL observées chez les animaux [31,32,33]. Le DINCH a été étudié par Schütze et al. [34], il n'est ni toxique pour la reproduction, ni un perturbateur endocrinien chez les rongeurs, mais une hyperplasie de la thyroïde et des signes de toxicité rénale ont été observés [34,35].

De nombreuses études ont estimé la cinétique du métabolisme DEHP par quantification de l'excrétion urinaire de leurs principaux métabolites primaires et secondaires [36,37,38,39,40,41]. Pour d'autres par contre, des analyses ont été effectuées sur la base de plastifiants deutérés (D2 ou D4-DEHP, D2 ou D4-DINCH, D2 ou D4-DINP): Après l'administration à des souris, des échantillons d'urines ont été analysés par LC-MS pour mesurer les concentrations en métabolites [39,42]. Ces résultats indiquent que les plastifiants sont métabolisés in vivo. Ils sont tout d'abord clivés en mono-ester (ou diester pour TOTM) par des estérases. Les monoesters formés sont par la suite métabolisés en dérivés carboxylés et hydroxylés par les enzymes hépatiques. Ces métabolites secondaires formés sont enfin glucuronoconjugués et éliminés par voie urinaire [43].

L'équipe du projet ARMED UMR 990 Clermont-Ferrand a procédé pour la première fois de la synthèse totale des métabolites primaires de ces plastifiants à savoir, le MOTM, le MEHA, le MEHT, le MINP, le MINCH, le MMeOP (isomère du MINP) et le MMeOCH (isomère du MINCH). Les métabolites synthétisés sont chimiquement conformes et purs. Les résultats des essais de cytotoxicité peuvent donc être imputés aux molécules synthétisées et non aux impuretés. Ces substances sont hydrophobes et ne peuvent pas être utilisées directement pour le contact direct avec des cellules dans un milieu de culture. Il est donc nécessaire d'utiliser un solvant ou véhicule de ces matériaux, non cytotoxique par lui-même sur les cellules pour effectuer les tests. Le DMSO a été utilisé à cet effet [44]. Des essais de

solubilité ont montré que les plastifiants sont solubles jusqu'à une concentration de 1% dans une solution mère de DMSO. Nous avons validé les concentrations maximales de DMSO qui peuvent être utilisés en présence de L929, selon notre protocole expérimental (7 jours de culture des cellules à une densité cellulaire initiale de 10^4 cellules / puits). D'après des données de la littérature et nos expérimentations, le DMSO peut être utilisé à une concentration maximale de 1%. Pour éviter les biais méthodologiques, tous les tests (Milieu de culture + % DMSO + %de plastifiant) ont été comparés avec un contrôle DMSO (milieu de culture + % DMSO). La norme ISO EN NF 10 993-5 recommande de réaliser les tests de cytotoxicité sur une durée minimale de 24h, la durée maximale n'étant pas précisée, et dépendante des méthodes utilisées. Nous avons mené nos expérimentations sur 7 jours pour se rapprocher de la réalité d'usage clinique des dispositifs médicaux. En effet, un dispositif médical en PVC est rarement utilisé en continu plus de 7 jours. Pour cela, il a fallu d'abord valider la possibilité de maintenir une culture cellulaire sur 7 jours dans les différents systèmes d'expérimentation. La croissance cellulaire des témoins des différentes conditions expérimentales est normale et progressive de J1 à J7. Les résultats obtenus confirment la validité de notre modèle d'étude. Toute diminution significative de la prolifération d'une culture cellulaire au contact d'une substance test par rapport au témoin peut donc être imputée au produit testé. Nous avons choisi d'évaluer la cytotoxicité des plastifiants selon une méthode quantitative. Le test MTT est couramment décrit dans la littérature pour l'évaluation de la biocompatibilité des biomatériaux. Son principe est basé sur la capacité des enzymes mitochondriales des cellules viables de cliver le réactif MTT en cristaux de formazan. Nous avons vérifié la spécificité du MTT test pour les cellules viables par ajout d'actinomycine D qui induit l'apoptose. La comparaison des résultats du MTT test entre le témoin et les puits tests contenant de l'actinomycine D montre la diminution significative des densités optiques des puits contenant cette substance, signe d'une diminution du nombre de cellules viables. Ce résultat confirme la spécificité du MTT test pour quantifier la viabilité cellulaire.

Les fibroblastes murins L929 ont été cultivées en présence des plastifiants et leurs métabolites primaires à trois concentrations différentes (0,01 ; 0,05 et 0,1 mg/ml) pendant 7 jours. A 0,01 mg/mL, aucun effet cytotoxique n'a été observé quelque soit le plastifiant. Le DEHP et le DINCH provoquent une diminution de la prolifération des cellules L929 à partir de

la concentration 0,05 mg/mL et leur effet est potentialisé à plus forte concentration. Le DINCH est autant cytotoxique que le DEHP sur les cellules L929. Ces résultats sont intéressants vu la différence de structure chimique entre les deux plastifiants. Le DEHP est un phtalate possédant un noyau aromatique sur lequel est greffé deux chaînes ethylhexanol alors que le DINCH n'a pas de noyau aromatique mais correspond à un noyau cyclohexane avec deux chaînes lipophiles greffées sur la fonction ester. Le DINP provoque une inhibition de la prolifération cellulaire (20-30%) à partir de 0,1 mg / ml, tous les autres plastifiants (par exemple TOTM, DEHA et DEHT) n'entraînent aucune différence significative par rapport au DMSO quelle que soit la concentration testée. Cette cytotoxicité observée du DINP peut être corrélée aux résultats des études chez l'animal résumées dans le tableau 7 [9]. En effet, la NOAEL du DEHP étant de 4.8 mg/kg/jr pour l'expression de sa toxicité, celle du DINP 15mg/kg/jr est proche de celle du DEHP. De même, les NOAEL du DEHT, TOTM, DINCH et du DEHA pour l'expression de leur toxicité sont respectivement de 78, 100, 107 et 200 mg/kg/jr bien supérieure à celle du DEHP. Le TOTM, l'un des plastifiants alternatifs les plus utilisés, présente un profil de toxicité intéressante malgré son interdiction dans les applications alimentaires. Si l'on considère le seuil de cytotoxicité décrit dans la norme EN 10993-5, le DEHP et le DINCH ont un fort potentiel cytotoxique (seuil de viabilité <70%).

Tableau 7: Récapitulatif des NOAEL des plastifiants alternatifs.

Plastifiants	DEHP	DINP	DEHT	TOTM	DINCH	DEHA
NOAEL (mg/kg/jr)	4.8	15	78	100	107	200

En ce qui concerne les métabolites primaires des plastifiants du PVC, leurs effets sur la viabilité des cellules L929 sont très différents. A partir de 0,05 mg / mL, presque tous les métabolites sont cytotoxiques, à l'exception du MOTM. Le MEHT et le MINCH sont autant toxiques que le MEHP. Leurs molécules mères (le DEHT et le DINCH, respectivement) ne provoquent aucun effet sur la viabilité cellulaire à cette concentration. A 0,1 mg / ml, MEHT et MINCH sont aussi toxiques que le DEHP et plus que le MEHP. Le MINP est

faiblement toxique à 0,05 mg / mL, mais entraîne une diminution très importante de la viabilité cellulaire à 0.1 mg/mL (80% de mort cellulaire). L'isomère de MINCH (MMeOCH) présente une activité cytotoxique analogue à 0,05 mg / mL (15% de mort cellulaire), mais il est également plus toxique que le MEHP et le DEHP à 0,1 mg / mL.

Au vue de ces résultats, nous pouvons considérer que la métabolisation des plastifiants augmente leur cytotoxicité. Par exemple, dans la littérature, il a été démontré que le MEHP, le métabolite primaire biologiquement actif de DEHP [45], est 10 fois plus puissant que le DEHP [46]. Le MEHP est un activateur bien connu de la famille des récepteurs PPAR nucléaires [47,48]. Pour les autres métabolites, leur toxicité est mal connue. Une étude récente montre que le MINCH (50, 100 uM) comme le MEHP (50 uM) est également un agoniste potentiel des récepteurs PPAR- α et un disrupteur métabolique, capable d'induire la différenciation des préadipocytes SVF, qui peuvent interférer avec le système endocrinien chez les mammifères [49]. Les métabolites primaires sont plus toxiques que les plastifiants eux-mêmes mais ces résultats doivent être interprétés en fonction de la capacité de métabolisation *in vivo* interindividuelle et inter espèce. Ces informations ne sont pas documentées dans la littérature, raison pour laquelle il est nécessaire d'effectuer des études *in vivo* de toxicité animale à partir des métabolites primaires et secondaires identifiés de chaque plastifiant. En effet, Koch et al. 2013 [40] ont quantifié la quantité de MINCH excrété dans l'urine après une absorption de DINCH par voie orale. Cependant, ils ne décrivent pas le pourcentage d'absorption du DINCH, son taux de métabolisme et le taux de métabolisation du MINCH en ses métabolites secondaires (Cx-Minch, OH-Minch et OXO-Minch). Ainsi, la valeur de 1% de MINCH quantifié dans l'urine ne préjuge pas de la quantité de MINCH formé et excrété à partir du système vasculaire. La littérature montre que l'absorption des plastifiants après exposition par voie orale est très faible chez les rongeurs (50% pour le DEHP) [39].

En récapitulatif, les résultats de notre étude sont résumés dans la figure 17 où nous pouvons distinguer dans les conditions expérimentales décrites précédemment les molécules non cytotoxiques n'ayant pas d'effet significatif sur la prolifération cellulaire des cellules L929 (DEHT, DEHA, TOTM, MOTM et MMeOP) et celles qui provoquent une diminution significative de la prolifération cellulaire de façon dose-dépendante (DINP, DINCH, DEHP, MEHT, MINP, MEHA, MINCH, MMeOCH et le MEHP).

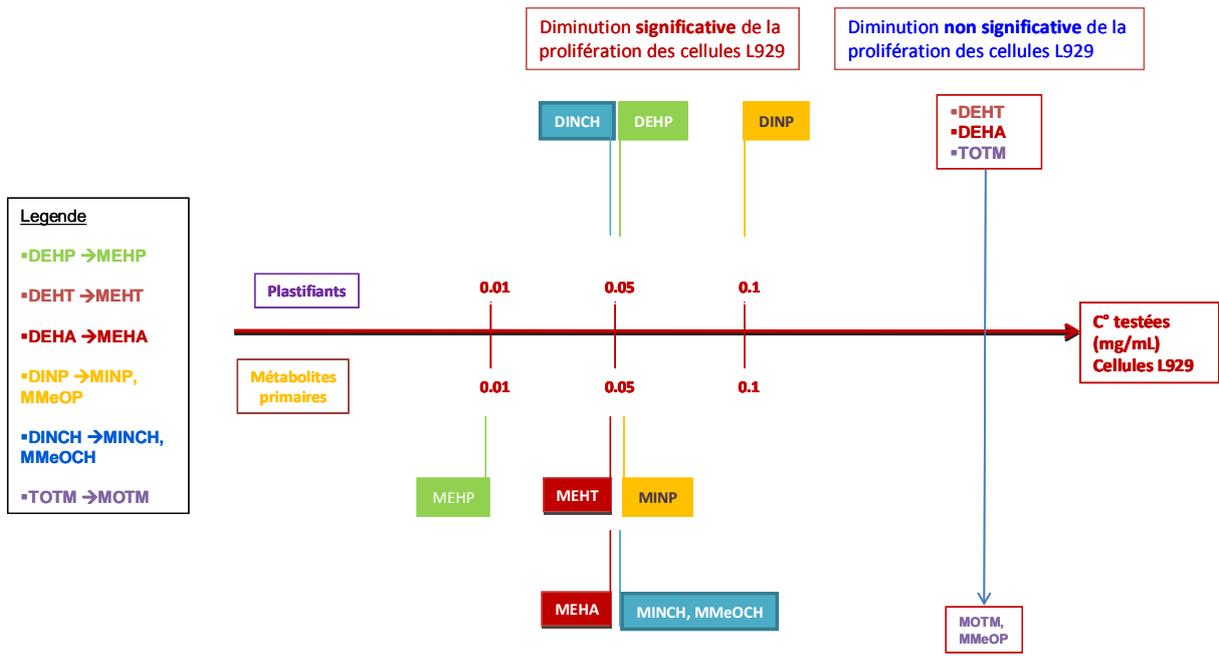


Figure 17 : Synthèse de la cytotoxicité des plastifiants et leurs métabolites primaires sur les cellules L929 aux concentrations de 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL et 0.1 mg/mL.

CONCLUSION

Les résultats obtenus à partir du TOTM sont très encourageants, par rapport aux autres plastifiants. En effet ce plastifiant et son métabolite primaire le MOTM n'ont pas montré de toxicité sur les cellules L929. Ces données sont très intéressantes parce qu'il a été démontré la prédominance du TOTM dans 32 DM en PVC contenant du DEHP (<0,1% p / p), du DEHT, et parfois du DEHA [50]. Il semble présenter un profil d'agent plastifiant intéressant pour les dispositifs médicaux. Les résultats doivent être interprétés et mis en corrélation avec les essais d'extraction de plastifiants effectués dans des conditions cliniques. En effet, un dispositif de perfusion utilisé une fois dans la vie d'un patient pendant 24 heures présente un risque plus faible qu'un circuit d'hémodialyse utilisé pendant 4 heures trois fois par semaine. Ainsi, pour évaluer le risque d'exposition des patients, il sera nécessaire de déterminer la quantité d'extraction de plastifiant par gramme de PVC dans des conditions cliniques. Cette étude est particulièrement nécessaire pour les dispositifs médicaux utilisés pour l'accès vasculaire. L'un des objectifs du projet ARMED est de proposer un modèle de simulation de la migration [5]. En effet, le SCENIHR 2015 [51] a rapporté des profils de migration différents entre les plastifiants. En raison de la toxicité des métabolites primaires de plusieurs plastifiants alternatifs (MEHT, MINP, MINCH et MMeOCH), il semble également approprié de vérifier la présence et d'étudier les toxicités de leurs métabolites secondaires. De cette étude ARMED, il a été initié le projet ARMED NEO qui tient compte des conclusions préliminaires du projet ARMED dans sa globalité. Son objectif est l'évaluation du risque inhérent à la migration des plastifiants intégrés au sein des dispositifs médicaux en PVC plastifié en Néonatalogie. Au cours de ce projet, il sera estimé le relargage du TOTM comparé à celui du DEHP dans des simulants au cours de différents actes médicaux. Les migrants obtenus seront ensuite utilisés pour effectuer des tests de cytotoxicité. Le potentiel de disruption endocrinienne du TOTM sera évalué par des tests à l'ARN sur différentes lignées cellulaires. Des essais de docking modélisant la fixation des plastifiants sur les récepteurs nucléaires responsables des différents effets néfastes observés avec le DEHP seront également effectués dans ce projet.

BIBLIOGRAPHIE

1. (2007) DIRECTIVE 2007/47/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL. Journal officiel de l'Union européenne: L247/223 (228).
2. EC (European Union R (2008) The European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation 2008. 1272 / 2008.
3. (2009) NF EN 10993 Biological evaluation of medical devices.
4. (2009) NF EN 10993-5 Cytotoxicity assay.
5. L. Bernard RC, C. Breyse, B. Decaudin, V. SAUTOU for ARMED study group (2015) Migrability of PVC plasticizers from medical devices into a simulant of infused solutions. International journal of pharmaceutics 485: 341-347.
6. L. Bernard RC, MC. Chagnon, F. Abdoulouhab, B. Decaudin, C. Breyse, S. Kauffmann, B. Cosserant, B. Souweine, V. SAUTOU for ARMED study group (2015) Migration of plasticizers from PVC medical devices: Development of an infusion model. International journal of pharmaceutics 494: 136-145.
7. RJ JRaR (1973) Extraction, localization and metabolism of di-2-ethylhexyl phthalate from PVC plastic medical devices. Environ Health Perspect
8. Rie Ito FS, Naoko Miura, Migaku Kawaguchi, Koichi Saito, Hiroyuki Nakazawa* (2006) Effect of sterilization process on the formation of mono(2-ethylhexyl) phtalate. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41: 455-460
9. SCENIHR (2008) (Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks) opinion on the safety of medical devices containing dehp- plasticized pvc or other plasticizers on Neonates and other groups possibly at risk
10. Falcy M DJ, A. Laudet-Hesbert, S. Miraval, E. Pasquier, J.C. Protois. (2004) Phtalate de bis(2-ethylhexyle). INRS fiche toxicologique 61.
11. Koch HM, Bolt, H. M., Preuss, R., and Angerer, J. (2005a) New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. Arch Toxicol 79: 367–376.
12. Shaffer C CC, Smyth H. (1945) Acute and subacute toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate with note upon its metabolism. J Indus Hygiene Toxicol 27: 130.
13. Arcadi FA, Costa C, Imperatore C, Marchese A, Rapisarda A, et al. (1998) Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the Long-Evans rat. Food Chem Toxicol 36: 963-970.

14. Li L JW, Orth J. (1999) Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 152: 258-265.
15. M. M (1996) Oncogenicity study in rats with di-2-ethylhexylphthalate including ancillary hepatocellular proliferation and biochemical analysis.
16. Kevy SV, Jacobson MS (1982) Hepatic effects of a phthalate ester plasticizer leached from poly(vinyl chloride) blood bags following transfusion. *Environ Health Perspect* 45: 57-64.
17. Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ (1994) Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 128: 216-223.
18. Crocker JF, Safe SH, Acott P (1988) Effects of chronic phthalate exposure on the kidney. *J Toxicol Environ Health* 23: 433-444.
19. Ward JM PJ, Perella CM, Gonzalez FJ. (1998) Receptor and non receptor mediated organ-specific toxicity of DEHP in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice. *Toxicol and Pathol* 26: 240-246
20. Peters JM TM, Keen CL, Gonzalez FJ (1997) DEHP induces a functional zinc deficiency during pregnancy and teratogenesis that is independent of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Teratology* 56: 311-316
21. INRS (2012) Produits chimiques cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction, classification réglementaire ED 976. 2 ed. pp. 45.
22. Julianne Simmchen RVaJS (2012) Progress in the Removal of Di-[2-Ethylhexyl]- Phthalate as Plasticizer in Blood Bags. *Transfusion Medicine Reviews* 26: 27-37.
23. EDS Van Vliet ER, JS Chhabra, GP Bergen and RM Whyatt (2001) A review of alternatives to di (2-ethylhexyl) phthalate-containing medical devices in the neonatal intensive care unit. *Journal of Perinatology* 31: 551–560
24. Jayakrishnan LSeA (1998) Migration resistant, blood-compatible plasticized polyvinyl chloride for medical and related application. *Artificial Organs* 22: 222-229
25. N. Narayana Reddy YMM, K. Varaprasad, S. Ravindra, K. Vimala, K. Mohana Raju (2009) Surface Treatment of Plasticized Poly(vinyl chloride) to Prevent Plasticizer Migration. *Journal of Applied Polymer Science* DOI
26. Risks) SCoEaN-IH (2008) Opinion on the safety of medical devices containing dehp plasticized pvc or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk.
27. Kleeff J KM, Sawhney H, Korc M. (2000) Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 86(3): 399-407.

28. K. Miyata KS, S. Houshuyama, N. Imatanaka, T. Umamo, Y. Minobe, K. Yamasaki (2006) Subacute oral toxicity study of di(2-ethylhexyl)adipate based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline no. 407". Arch Toxicol 80: 181-186.
29. U. Wirnitzer UR, A. Katerkamp, A. Schachtrupp (2011) Systemic toxicity of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHT) in rodents following four weeks of intravenous exposure. Toxicol Lett 205: 8-14.
30. Deyo. JA (2008) Carcinogenicity and chronic toxicity of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHT) following a 2-year dietary exposure in Fischer 344 rats. Food Chem Toxicol 46: 990-1005.
31. J. Borch OL, U. Hass, A. M. Vinggaard (2004) Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. Reprod Toxicol 18: 53-61.
32. P.J. Patynaa RPB, R.A. Davib, D.J. Letinskib, P.E. Thomasa, K.R. Coopera, T.F. Parkertonb (2006) Hazard evaluation of diisononyl phthalate and diisodecyl phthalate in a Japanese medaka multigenerational assay. Ecotoxicol Environ Saf 65: 36-47.
33. K. M. Kransler ANB, R. H. McKee. (2012) A comprehensive review of intake estimates of di-isononyl phthalate (DINP) based on indirect exposure models and urinary biomonitoring data. Regul Toxicol Pharmacol 62: 248-256.
34. André Schütze MK-G, Petra Apel, Thomas Brüning, Holger M. Koch (2014) Entering markets and bodies: Increasing levels of the novel plasticizer Hexamoll® DINCH® in 24 h urine samples from the German Environmental Specimen Bank International Journal of Hygiene and Environmental Health 217: 421-426.
35. Andre Schütze ML, Katarzyna Gawrych, Marike Kolossa-Gehring, Petra Apel,, Thomas Brüning HMK (2015) Development of a multi-compartment pharmacokinetic model to characterize the exposure to Hexamoll® DINCH. Chemosphere 128: 216-224.
36. H. Fromme AS, T. Lahrz, M. Kraft, L. Fembacher, S. Siewering, R. Burkardt, S. Dietrich, H.M. Koch, W. Völkel (2016) Non-phthalate plasticizers in German daycare centers and human biomonitoring of DINCH metabolites in children attending the centers (LUPE 3). International Journal of Hygiene and Environmental Health 219: 33-39.
37. A. Schütze CP, J. Angerer, T. Weiss, T. Brüning, H. M. Koch. (2012) Quantification of biomarkers of environmental exposure to di(isononyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) in urine via HPLC-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 895-896, 123-130.
38. A. Schütze MK-G, P. Apel, T. Brüning, H. M. Koch. (2014) Entering markets and bodies: increasing levels of the novel plasticizer Hexamoll® DINCH® in 24 h urine samples from the German Environmental Specimen Bank. . Int J Hyg Environ Health 217: 421-426.

39. W. A. Anderson LC, S. Hird, J. Jeffery, M. J. Scotter (2011) A twenty-volunteer study using deuterium labelling to determine the kinetics and fractional excretion of primary and secondary urinary metabolites of di-2-ethylhexylphthalate and di-iso-nonylphthalate. *Food Chem Toxicol* 49: 2022-2029.
40. H. M. Koch AS, C Pälme, J. Angerer, T. Brüning (2013) Metabolism of the plasticizer and phthalate substitute diisononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) in humans after single oral doses. *Arch Toxicol* 87: 799-806.
41. Holger M. Koch AS, Claudia Pälme, Jürgen Angerer, Thomas Brüning (May 2013) Metabolism of the plasticizer and phthalate substitute diisononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH®) in humans after single oral doses
Archives of Toxicology 87: 799-806.
42. H. M. Koch JA (2007) Di-iso-nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine after a single oral dose of deuterium-labelled DINP. . *Int J Hyg Environ Health* 201: 9-19.
43. Martis LF, E.; Woods, E. (1987) Tissue distribution and excretion of tris-(2-ethylhexyl) trimellitate in rats. *J of Toxicol Environ Health* 20: 357-366.
44. W. Wang ZRC, M. S. Basavarajappa, R. K. Gupta, J. A. Flaws. (2012) Di (2-ethylhexyl) phthalate inhibits growth of mouse ovarian antral follicles through an oxidative stress pathway. . *Toxicol Appl Pharmacol* 258: 288-295.
45. Frederiksen H. SNE, Andersson A.M. (2007) Metabolism of phthalates in humans. *MolNutrFood Res* 51: 899-911.
46. Huber W.W. G-KB, Schulte-Hermann R. (1996) Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. . *Crit Rev Toxicol* 26: 365-481.
47. E.K. Maloney DJW (1999) Trans-Activation of PPAR alpha and PPAR gamma by structurally diverse environmental chemicals. . *ToxicolApplPharmacol* 161: 209-218.
48. Hurst C.H. WDJ (2003) Activation of PPAR alpha and PPAR gamma by environmental phthalate monoesters. . *ToxicolSci* 74: 297-308.
49. E. Campioli TBD, F. Deschamps, V. Papadopoulos (2015) Cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid diisononyl ester and metabolite effects on rat epididymal stromal vascular fraction differentiation of adipose tissue. *Environ Res* 140: 145-156.
50. D. Bourdeaux MY, P. Chennell, V. Larbre, T. Eljezi, L. Bernard, V. Sautou, ARMED study group. (2016) Analysis of PVC plasticizers in medical devices and infused solutions by GC-MS. *J Pharm Biomed Anal* 118: 206-213.

51. SCENIHR (25 juin 2015) (Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks) Opinion on The safety of medical devices containing DEHPplasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk (2015 update).

ANNEXE

Production scientifique :

- Etudes de biocompatibilité des plastifiants. Communication orale, **ARMED, Clermont-ferrand Avril 2016.**
- Cytotoxicité des plastifiants alternatifs au DEHP dans les dispositifs médicaux. Communication orale, **Europharmat, Tours Octobre 2014.**
- Etudes de biocompatibilité des plastifiants. Communication orale, **ARMED, Clermont-ferrand Avril 2014.**

Articles soumis pour publication :

Plasticizers migration from PVC medical devices in an ECMO model: influence of flow, mechanical stress and evaluation of cytotoxicity.

Charlotte FERNANDEZ-CANAL, Pierre PINTA, Teuta ELJEZI, Virginie LARBRE, Sophie KAUFFMANN, Lionel CAMILLERI, Lise BERNARD, Gael GRIMANDI, Valérie SAUTOU for Armed Study Group.

In vitro cytotoxic effect of DEHP alternatives plasticizers and their corresponding primaries metabolites.

Teuta Eljezi,^{a, b, 1} Pierre Pinta,^{c, 1} Damien Richard,^d Jérémy Pinguet,^d Jean-Michel Chezal,^a Valérie Sautou,^{b, e} Gaël Grimandi,^c Emmanuel Moreau,^{a, *}

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

^b CHU Clermont-Ferrand, Pôle Pharmacie, Rue Montalembert, 63003 Clermont-Ferrand, France

^c INSERM, U791, LIOAD, Nantes, F-44042, France Université de Nantes

^d Service de Pharmacologie, Hôpital Gabriel-Montpied, CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

^e Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 4676C-BIOSENS, 63000 Clermont-Ferrand, France.

* corresponding author: emmanuel.moreau@udamail.fr

¹ both authors contributed equally

Abstract

Phthalic acid esters are usually used to enhance plasticity of PVC medical devices. So it results a high exposure risk to humans and the environment in clinical situation. This study focused on the cytotoxicity of alternatives plasticizers of **DEHP** (**TOTM**, **DEHA**, **DINP**, **DEHT** and **DINCH**) and their primaries metabolites (**MOTM**, **MEHA**, **MINP**, **MMeOP**, **MEHT**, **MINCH**, **MMeOCH**). The postulated primaries metabolites were synthesized because they are not marketed. The cytotoxicity assays were performed on L929 murine cells at the concentration of 0.01 mg/ml, 0.05 mg/ml, and 0.1 mg/ml according to the ISO-EN 10993-5 standard design for medical devices biocompatibility. The results assume that **DEHP**, **DINP** and **DINCH** are cytotoxic at the highest concentration (0.1 mg/ml) during 7 days of exposition. Their corresponding metabolites are more cytotoxic at the same concentration. In contrast, **TOTM** and its corresponding metabolites (**MOTM**) are not cytotoxic. The DEHA is not cytotoxic only its corresponding monoester (**MEHA**) induces a cytotoxic effect at 0.05 mg/ml. As Medical devices can release plasticizers and substitute, it is important to check their effects and these of their corresponding metabolites to protect patient in clinical use. In term of biocompatibility, in first line, the standard recommended to perform cytotoxicity assays.

Keywords

Plasticizers, metabolites synthesis; cytotoxicity, DEHP alternatives plasticizers, phthalates

Abbreviations

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

Introduction

In the field of medical devices, PVC (polyvinyl chloride) is widely used especially to produce flexible tubings such as infusion sets or extracorporeal circulation lines. To provide and maintain flexibility, plasticizers are added to the PVC matrix. However, it is now widely accepted that these plasticizers can migrate from the PVC matrix into infused drug solutions or biological fluids, and thus come into contact with the patient. Some of these chemical compounds are likely to present a danger to the patient, as it has been demonstrated for diethylhexyl phthalate (**DEHP**), which has now been classified as CMR 1B (carcinogenic, mutagenic or toxic to reproduction) under the CLP Regulation (European Union, R 2008). It is now well known that the monoethylphthalate, **MEHP**, produced *in vivo* by enzymatic hydrolysis of the plasticizer is more toxic than the plasticizer itself (ECB, 2004;

CRHER, 2005; SCENIHR, 2015). The use of **DEHP** in PVC medical devices was therefore challenged by the European authorities (European Union, R 2007) and in 2012 a French law has forbidden the use of **DEHP** plasticized PVC medical tubings in neonatology and maternity services from July 1, 2015 (French law, 2012). Based on their physicochemical properties and some animal toxicology data, the manufacturers chose trioctyltrimellitate (**TOTM**), di-ethylhexylterephthalate (**DEHT**), diisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate (**DINCH**), di-isononylphthalate (**DINP**) and diethylhexyladipate (**DEHA**), to replace DEHP in PVC medical devices (Figure 1). However data on the migration of these additives from medical devices and their potential human toxicity are still insufficient.

To be marketed, medical devices must meet some essentials requirements. These mainly concern their performance, safety, toxicity and biocompatibility. The last three criteria must consider the interactions between tissues in contact with the materials, but also other tissues may be affected. The evaluation of the device must study the release of substance from the devices but also those derived from degradation. Finally the characterization must consider the duration of contact with the body. To study toxicity and biocompatibility, *in vivo* and *in vitro* tests are proposed in the standard EN ISO 1993. The devices must undergo the described tests according to the level of risk patients are exposed. The cytotoxicity test described in EN ISO 10993-5 is mandatory regardless of the medical device. Indeed, the authors of the standard considered that the toxicity assessment of a medical device, material or additive on a cell model can be predictive of *in vivo* toxicity. Any apparent toxicity in this model does not necessarily leads to rejection of the product concerned but requires further investigations. Recommended tests depend on the final use of the medical device. For example, infusion set will not have the same requirements as a central catheter directly in contact with blood. Manufacturers mostly test the the medical device itself and not the different materials used in the composition of the medical device separately. The secondary material can be those used to make the gluing or those used for annex elements such as fittings. Most of the time, no data is available on the additives used for the main material or the secondary one. There are a lot of additives which facilitate the manufacturing or use of the medical device. Thus, manufacturers often use plasticizers, lubricants or dyes for example. The biocompatibility of these additives which affect the ergonomics properties of medical devices is poorly evaluated.

Furthermore, there is no disposable information on the own toxicity of the primary metabolites of these plasticizers such as it is the case for **MEHP**. The aim of this study was to assess the toxicity of several alternative plasticizers and their primary metabolites by cytotoxicity assays performed according to the EN 10993-5 norm using the MTT assay. The primary metabolites of **TOTM**, **DEHT**, **DEHA**, **DINCH**, **DINP** and **DEHA** are not available on the market, so it was necessary to perform their chemical synthesis. The production of pure metabolites allows to study their respective cytotoxicity and to compare with **MEHP** in the same conditions.

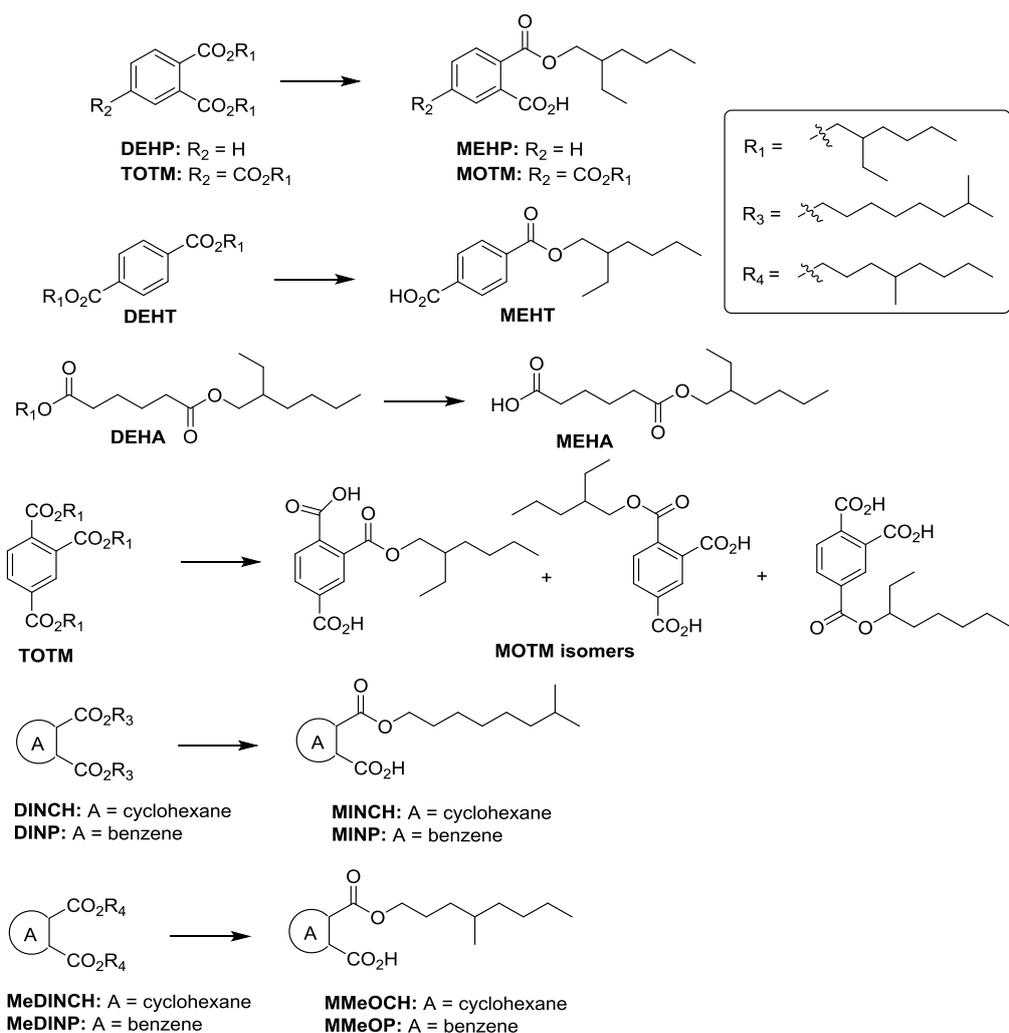


Figure 1 : Plasticizers usually used in medical devices and their corresponding primaries metabolites

Materials and methods

Chemical, biochemical and reagents

Unless otherwise stated, all manipulations were performed under argon; all reagents were purchased from the following commercial suppliers: Sigma-Aldrich, Acros Organics, Carlo Erba, TCI Europa, Alpha Aesar. Anhydrous DMF, anhydrous triethylamine were purchased from Acros Organics. THF was distilled over benzophenone and sodium. Dichloromethane was distilled over hydride calcium. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were acquired on Bruker AC-200 operating at 200 and 50 MHz for 1H NMR and ^{13}C NMR, respectively. All 1H NMR spectra are reported in δ units, parts per million (ppm) and the coupling constants are indicated in hertz (Hz). The following abbreviations are used for spin multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, and br = broad. The chromatographic system consisted of an HTC PAL autosampler, a Transcend TLX-1 HTLC System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, United States), The HRMS analysis was performed using a Thermo Exactive benchtop Orbitrap[®] instrument. TLC was performed on pre-coated silica gel sheets POLYGRAM[®] (60F254 plates) and visualized under UV light (254 nm). Column chromatography was

performed using silica gel normal phase (35-70 μm). Uncorrected melting points (Mp) were recorded on an Electrothermal IA9300. Infrared spectra (IR) were recorded on a Bruker FT Vector 22.

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

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

Methodologies for the synthesis of primaries metabolites

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

Briefly, to a solution of the appropriate anhydride (**1a**, **b**), (**7**), (**18**) or (**19**) (1eq.) dissolved in dry pyridine, 2-ethylhexanol (**2**), 7-methyloctanol (**17**) or 4-methyloctanol (**29**) (1eq.) was added. The resulting mixture was stirred at 125 °C (external temperature) until anhydride derivative was disappeared (TLC monitoring). The mixture was quenched with cold water (50 mL) and extracted with diethyl ether (8 x 40 mL). The combined organic layer was washed with a solution of hydrochloric 10% (100 mL). Finally, the mixture was extracted with 0.4M K_2CO_3 (100 mL). The aqueous basic layer was acidified to pH 1 with a solution of hydrochloric acid (1M) and then extracted with Et_2O (4 x 100mL). The combined organic layer was washed with brine (150 mL), dried over MgSO_4 and evaporated under reduce pressure.

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

Biocompatibility assays

Solubilization of the plasticizers

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

Cells cultures

L929 cells were cultured in 96 wells plates (without plasticizers) with DMEM supplemented with 10% of SVF, 100 UI/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin (complete DMEM) at 37°C with 5% of CO₂.

MTT assay procedure

MTT reagent was used at a concentration of 5 mg/mL in PBS. At the end of the cells cultures, the media were removed and 30µL of the MTT reagent were added in each well. Cells were then incubated for 3 h at 37°C with 5% of CO₂. Then the MTT reagent was removed and 200µL of Dimethylsulfoxid were added to each well (Multiwell plates without plasticizers). After 1h of formazan dissolution, the optical density (OD) of each well was measured at 570 nm (spectrophotometer VICTOR™ Multilabel HTS Counter PerkinElmer).

Specificity of the MTT assay

L929 cells were seeded in triplicates at 10⁴ cells/well. After 24 hours, the medium was replaced by 200 µL of the complete DMEM (control) or 200µL of the complete DMEM supplemented with 0.1% of actinomycin D. Cells were then cultured during 5 days with a medium change every day. MTT assays were performed every day for each condition. The quantification of the cells viability percentage was calculated using the following formula: ((OD test – OD control)/(OD control)).

Linearity of the MTT assay

L929 cells were seeded in triplicate at increasing number of cells per well (5x10³ - 10x10³ - 50x10³ - 100x10³ - 150x10³ - 200x10³ - 250x10³ - 300x10³ - 350x10³) in 96 wells plates. After 8h of adherence, the MTT assay was performed as explained previously.

Viability assay of the DMSO solvent

According to the work plasticizer solutions, L929 cells were cultured in complete DMEM supplemented with 0.1%, 0.5%, 1%, 2.5% and 5% of DMSO. Cells were seeded in triplicate at 10⁴ cells/wells. After 24 hours, the medium was replaced every day by 200 µL of the complete DMEM for the control and 200µL of the complete DMEM supplemented with DMSO at the selected concentrations. Cells were cultured during 7 days. A MTT assay was performed every day according to the MTT assay procedure.

Viability assays of the plasticizers

To assess the viability assay of the plasticizers, cells were seeded in triplicate at 10⁴ cells/wells. After 24 hours, the media were replaced by 200 µL of the followings solutions: i) control conditions with complete medium; ii) control DMSO conditions with the complete medium supplemented with the same concentration of DMSO as the plasticizers work solutions; iii) work solutions (0.1%, 0.5 % and 1%) of the plasticizers. Cells were cultured during 7 days with a medium change every day. A MTT assay and the quantification of the viability percentage were done every day.

Statistical analysis

The experiments performed in triplicates, were repeated at least two times, and the outcomes of one representative data set of each plasticizer are reported. Differences of viabilities percentages between the controls conditions vs the tests conditions were analyzed using the non parametric test of MANN-WHITNEY. *P* value of less than 0.05 was considered significant.

Results

Synthesis of metabolites

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

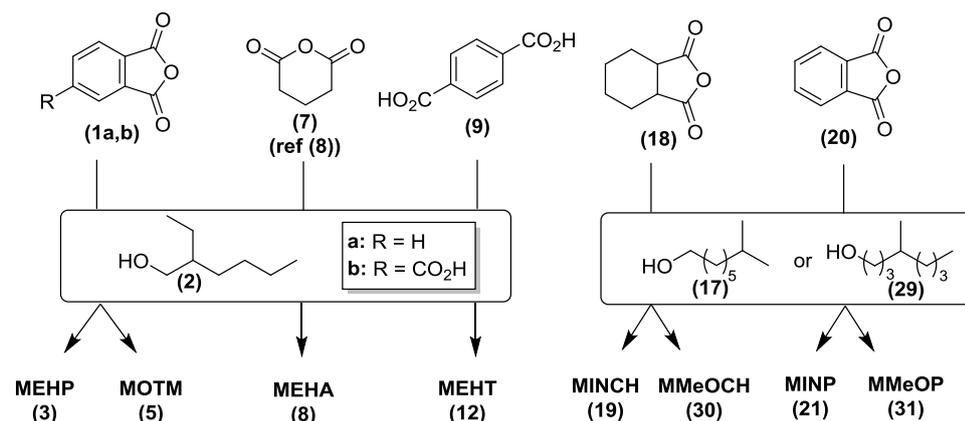


Figure 2 : Access to **MEHT**, **MEHA**, **MOTM**, **MINCH**, **MINP**, **MMeOCH** and **MMeOP** from 2-ethylhexanol (**2**), 7-methyloctanol (**17**) or 4-methyloctanol (**29**)

Access to **MINCH** and **MINP** was developed from condensation of 7-methyloctan-1-ol (**17**) and dihydro-2H-pyran-2,6(3H)-dione (**18**) or hexahydroisobenzofuran-1,3-dione (**20**), respectively. Compound 7-methyloctan-1-ol (**17**) was commercialized but it was very expensive. So, we developed its synthesis in four steps as described in Scheme 5S. Access to **MMeOCH** and **MMeOP** was developed from a similar procedure with 4-methyloctan-1-ol (**29**) (Scheme 6S). All intermediates and final compounds were analyzed by IR, ¹H and ¹³C NMR, and HRMS. For all details, see supporting information. The purity of our synthesized metabolites was 95%.

Biocompatibility assay

Specificity of MTT assay

Figure 3 shows the optical density obtained after MTT assay on L929 cells cultured in complete medium with and without Actinomycin D during 5 days. The optical density of control wells gradually increases from D1 to D5; L929 cells proliferate normally. The optical density in the wells cultured in the presence of actinomycin D reduces significantly from D1 compared to the control and tends to zero at D3. The apoptosis inductive effect of actinomycin D (Kleeff et al. 2000) causes cell death with a time dependant decrease close to 100% at D3 in the MTT assay.

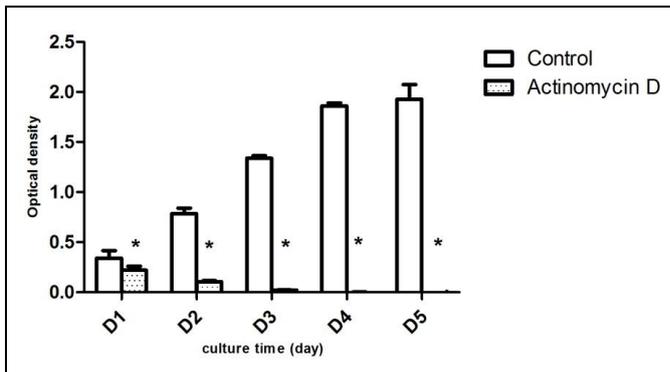


Figure 3: Specificity of the MTT assay. Optical density of the control wells vs the optical density of the actinomycin D wells. L929 cells were seeded at 10^4 cells/wells and cultured in Complete DMEM with and without actinomycin D (0.1%) during 5 days. MTT assays were done every day for each condition.

Linearity of MTT assay

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

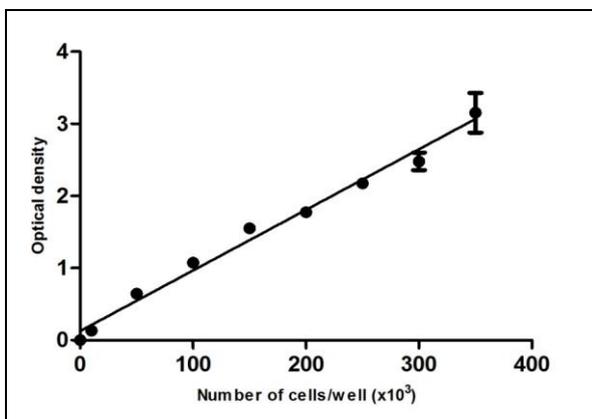


Figure 4 : Linearity of MTT assay. L929 cells were seeded at increasing numbers of cells per wells (10×10^3 - 50×10^3 - 100×10^3 - 150×10^3 - 200×10^3 - 250×10^3 - 300×10^3 - 350×10^3) in complete medium. After 8h of adherence, the MTT assay was performed for each well.

The DMSO solvent effect on the cells viability

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

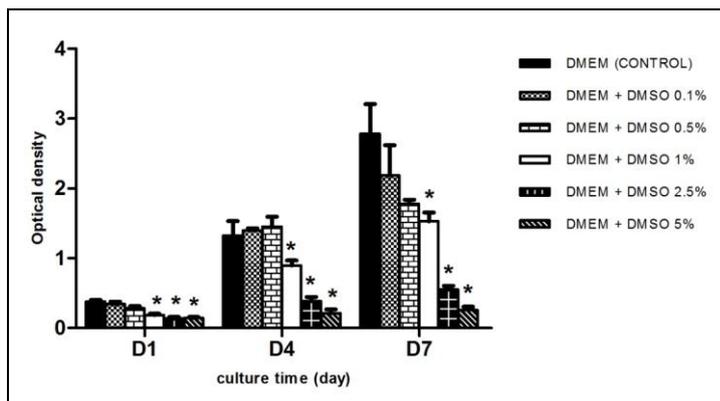


Figure 5 : Viability assays of the solvent DMSO. L929 cells were seeded at 10^4 cells /wells and cultured in complete medium with and without DMSO (0.1%, 0.5%, 1%, 2.5% and 5%) during 7 days. MTT assay was done every day.

Viability of cells when exposed to the plasticizers and their primaries metabolites

Figure 6 shows the results of viability tests, at day 7 (D7), performed on L929 cells cultured in the presence of three concentrations of plasticizers after 7 days of contact. Plasticizers cause no toxicity to the cells at the concentration of 0.01 mg/ml compared to the control containing DMSO at the same concentration. A decrease in cell viability was observed for **DEHP** and **DINCH** from the concentration of 0.05 mg/mL. For these two plasticizers, this decrease in viability is higher than 50%. **DINP** reduced cell proliferation from a concentration of 0.1 mg/mL (40%). For the others plasticizers (e.g. **TOTM**, **DEHA** and **DEHT**), there were no significant differences compared with DMSO whatever the three concentration tested.

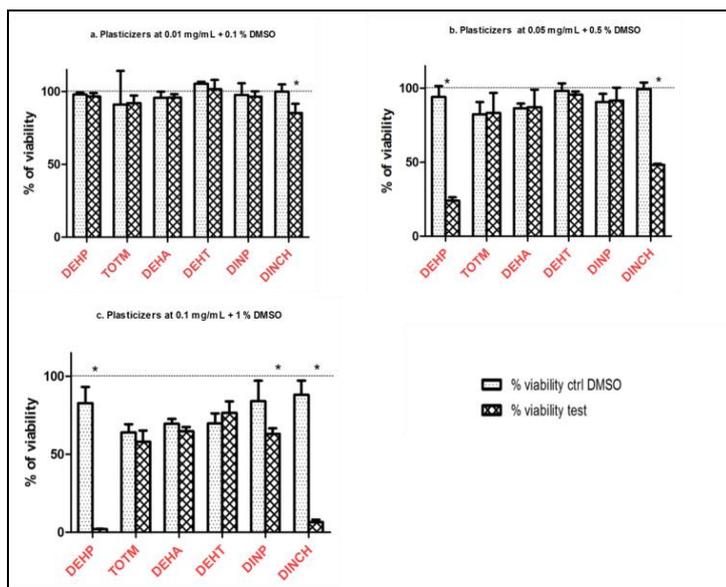


Figure 6 : Cytotoxicity test of plasticizers at 0.01 mg/mL(a), at 0.05 mg/mL and at 0.1 mg/mL day 7.

Outcomes of the cell viability analysis using MTT assay. L929 cells were seeded at 10^4 cells/wells and cultured during 7 days in 3 conditions with medium change every day: control (complete medium), control DMSO (complete medium supplemented with DMSO 0.1%, 0.5% and 1%) and test (work solutions of plasticizer in complete medium at 0.1% (0.01 mg/mL), 0.5% (0.05mg/mL) and 1% (0.1 mg/mL)). MTT assay and a quantification of the viability percentage were done every day

Figure 7 depicts the results of the plasticizers primary metabolites viability tests. From 0.01 mg/mL, only **MEHP** has an impact on the cell growth. Moreover, **MEHP** expressed a cytotoxicity of 50% to 70% respectively at 0.05mg/mL and 0.1 mg/ml. Compared to **MEHP**, effect on the L929 proliferation is different for all others studied primaries metabolites except for **MINCH** and **MEHT**: at 0.05 mg/ml, these latter ones are as cytotoxic as **MEHP** (about 50% cell death). From 0.1 mg/ml, they are much more cytotoxic than **MEHP** (98 and 99% of cell death observed for **MEHT** and **MINCH**, respectively versus 70% for **MEHP**). For **MMeOCH**, a structural isomer of **MINCH**, results are almost similar to those observed for **MINCH** from 0.05 to 0.1 mg/mL. On contrary, the **MMeOP**, a structural isomer of **MINP**, never decrease significantly the cell viability whatever the tested concentration. Concerning **MOTM**, no significant decrease of proliferation is observed compared to DMSO control whatever the tested concentration. **MEHA is weakly cytotoxic**, the cytotoxicity is a range of 20 to 30% at 0.05 and 0.1 mg/mL, respectively.

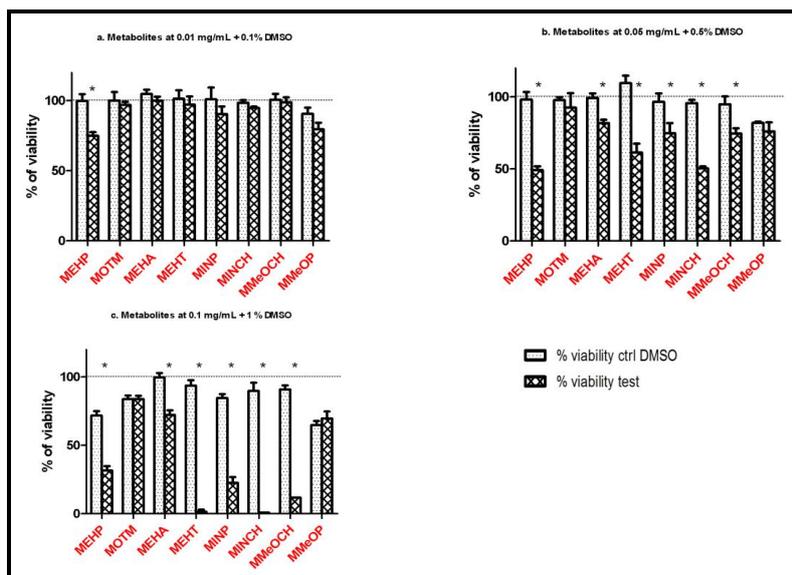


Figure 7 : Cytotoxicity test of primaries metabolites at 0.01 mg/mL(a), at 0.05 mg/mL and at 0.1 mg/mL day 7. Outcomes of the cell viability analysis using MTT assay. L929 cells were seeded at 10^4 cells/wells and cultured during 7 days in 3 conditions with medium change every days: control (complete medium), control DMSO (complete medium supplemented with DMSO 0.1%, 0.5% and 1%) and test (work solutions of plasticizer in complete medium at 0.1% (0.01 mg/mL), 0.5% (0.05mg/mL) and 1% (0.1 mg/mL)). A MTT assay and a quantification of the viability percentage were done every day.

In summary, we observed that MOTM and MMeOP are not cytotoxic whatever the tested concentrations. MEHA is weakly cytotoxic. MEHP, MEHT, MINP, MINCH and MMeOCH are cytotoxic with a concentration effect.

Discussion

Since **DEHP** plasticizer has been classified as CMR 1B, several substitute phthalate plasticizers with high molecular weight (**TOTM**, **DEHA**, **DEHT**, **DINP** or **DINCH**) have been used by manufacturers. Of course, special attention was paid about all phthalate substitutes because of their endocrine disrupting and reprotoxic properties. Except for **TOTM**, there are a lot of studies about alternative PVC plasticizers used by manufacturers. For **DEHA**, it was observed carcinogen properties to female B6C3F1 or a disturbance of the oestrous cycle and increased ovarian follicle atresia were detected in rats (Miyata et al. 2006). For **DEHT**, there were no effects on reproductive tissues, organs, kidneys, liver hepatocytes and peroxisomes which are known targets of **DEHP**-toxicity (Wirnitzer et al. 2011; Deyo, 2008). **DINP** and **DINCH** have been more studied. Level of **DINP** exposure is far below the no observed adverse effect levels in animals and also below health-based exposure guidance values identified by regulatory authorities and other authoritative bodies as representing acceptable levels (Borch et al. 2004; Patynaa et al. 2006; Kransler et al. 2012). **DINCH** have been studied by Schütze and co-workers. **DINCH** is neither a reproductive toxicant nor an endocrine disruptor in rodents. Thyroid hyperplasia and signs of renal toxicity were only observed at relatively high dosing levels in animals for both sexes (Schütze et al. 2015; Schütze et al. 2014).

Until now, all these numerous studies have estimated the kinetics of metabolism of **DEHP** plasticizers alternative from the urinary excretion of their main primary and secondary metabolites or the native plasticizers after administration of the PVC plasticizers. (Fromme et al, 2016; Schütze et al, 2012, 2014; Anderson et al, 2011; Koch et al., 2011, 2012, 2013). For others studies, analysis were conducted on the basis of plasticizers deuterated (D2 or D4-DEHP, D2 or D4-DINCH, D2 or D4-DINP): After administration to mice, urines samples were analyzed by LC-MS to measure the metabolites concentrations (Anderson et al, 2001, 2011; Koch et al, 2005, 2007).

In addition to these results, the literature reported that plasticizers are metabolised *in vivo*. In a first metabolism step, they are cleaved in monoester (or diester for **TOTM**) which are further oxidized in various way into alcohol, ketone or acid derivatives. These secondaries metabolites are recovered in urine (Martis et al. 1987). Until now, these metabolites are not all available on the market and several were produced after oral or intravenous administration of the plasticizers to animals and collected under glucuronated derivatives. After hydrolysis of these latter ones, primaries and secondaries metabolites were obtained. So, the low quantities obtained by these methods do not always lead to completed cytotoxicity studies. To avoid this limitation, here, we have proceeded for the first time of the total synthesis of the postulated primaries metabolites of these plasticizers which are **MOTM**, **MEHA**, **MEHT**, **MINP**, **MINCH**, **MMeOP** (isomer of MINP) and **MMeOCH** (isomer of MINCH) as they are described in the literature.

All primaries metabolites have successively been synthesized (for details, see figure 2 and supplementary material). The synthesized metabolites are chemically conform and pure and the results of cytotoxicity assays can be considered due to the synthesized molecules and not to impurities. The objective of our preliminary work was to compare the effect of these plasticizers and their metabolites on the *in vitro* cell culture models used to evaluate the biocompatibility according to the EN 10993. However, the literature has shown authors difficulties to apply the EN 10993-5 for plasticizers. In fact, these substances are hydrophobic and cannot be directly used for direct contact in a culture medium. So it is necessary to use a solvent of these materials, non-cytotoxic by itself, on the cells to perform the tests. DMSO was used for this purpose (Wang et al. 2012). Solubility tests showed that the plasticizers were soluble until a concentration of 1% in DMSO (data not shown). We validated the DMSO maximum concentrations that can be used in the presence of L929 according to our experimental protocol (7 days of cell culture at an initial cell density of 10^4 cells / well). then DMSO can be used to maximum concentration of 1%. To avoid methodological bias, all tests were compared with a control DMSO (medium supplemented with DMSO at the same concentration).

All plasticizers and their corresponding primaries metabolites have been directly cultured with murine L929 fibroblasts to three different concentrations (0.01, 0.05 and 0.1 mg/mL) for 7 days. Concerning to cytotoxicity of plasticizers, no effect was observed at 0.01 mg/mL **DEHP** and **DINCH** cause a decrease of L929 cells proliferation from the concentration of 0.05 mg/mL and their effect is dramatic at the highest concentration with total cell death. **DINCH** is as toxic as **DEHP** for the L929 fibroblast cells. These results are surprising because their chemical structures are very different. **DEHP** is a phthalate with two ethylhexanyl chain while **DINCH** has a no aromatic scaffold with two more lipophilic chain grafted on the ester function. Except for **DINP** that causes cell proliferation inhibition (20-30%) from 0.1 mg / mL, all others plasticizers (e.g. **TOTM**, **DEHA** and **DEHT**) have no significant differences compared with DMSO whatever the three concentrations tested. . On contrary, **TOTM**, one of the most widely used alternative plasticizers, presents an interesting toxicity

profile despite its ban in food applications. If we consider the threshold of cytotoxicity described in the standard EN 10993-5, the **DEHP**, the **DINCH** were equivalent in term of cytotoxicity (viability threshold <70%).

Concerning the primaries metabolites of PVC plasticizers, their effects on the L929 cells viability are very different when they are tested at the same three concentrations. From 0.05 mg/mL, all metabolites are cytotoxic, except **MOTM**. **MEHT** and **MINCH** are as toxic as **MEHP**. Their corresponding native plasticizers (**DEHT** and **DINCH**, respectively) which have no effect at this concentration. At 0.1 mg/mL, **MEHT** and **MINCH** are as toxic as **DEHP** as and more than **MEHP**. **MINP** is low toxic at 0.05 mg/mL, but viability cell decrease dramatically at 0.1 mg/mL to reach 80% of death cell e.g. more toxic than **MEHP** and with an effect similar to that observed with **DEHP**. The isomer of **MINCH** (**MMeOCH**) has a similar cytotoxic activity at 0.05 mg/mL (15% of cell death) but it is also more toxic than **MEHP** and has **DEHP**-effect at 0.1 mg/mL.

Thus, it can be considered that the metabolization of plasticizers increases their cytotoxicity. For example, in the literature, **MEHP**, the **DEHP** bioactive metabolite (Frederiksen et al., 2007), has been shown to be 10 times more potent than the **DEHP** (Huber et al., 1996). **MEHP** is a well-known activator of the PPAR family of nuclear receptors (Hurst and Waxman, 2003; Maloney and Waxman, 1999). For the other metabolites, their toxicity is not well known. Recent study assess that **MINCH** (50, 100 μ M) as **MEHP** (50 μ M) is also a potential PPAR- α agonist and a metabolic disruptor, able to induce SVF preadipocyte differentiation, that may interfere with the endocrine system in mammals (capioli et al. 2015). The primaries metabolites toxicity higher than plasticizers themselves must be interpreted depending on the *in vivo* metabolism and species. This information is not available and need to perform *in vivo* animal toxicity studies on primaries and secondaries metabolites identified for each plasticizer. Indeed, Koch and al. 2013 have quantified the amount of **MINCH** excreted in the urine after oral absorption **DINCH**. However, they do not describe the **MINCH** absorption percentage, its metabolism rate and the rate of metabolisation of **MINCH** to its secondary metabolites (**Cx-MINCH**, **OH-MINCH** and **OXO-MINCH**). So the value of 1% of **MINCH** quantified in the urine is not predictive of the amount of the **MINCH** formed and excreted from the vascular system. The literature shows that absorption of plasticizers after oral exposure is very low in rodents (50% for **DEHP**, Anderson et al. 2011)

Conclusion

The main result of this study is the **TOTM**, which compared to other plasticizers is less toxic on L929 cells. Its primary metabolite **MOTM** does not induce toxicity compared to the other metabolites. This data is very interesting because we have recently demonstrated that a predominance of **TOTM** in 32 PVC MDs accompanied by **DEHP** (<0.1% w/w), **DEHT**, and sometimes **DEHA** (Bourdeaux et al. 2016). On condition to obtain biosimilar model results, it appears to present an interesting plasticizer profile for medical devices. The results should be interpreted and correlated with plasticizers extraction tests performed in clinical conditions of use. Indeed, an infusion set used once in the life of a patient for 24 hours presents a lower risk of a hemodialysis circuit used for 4 hours three times a week. Thus, to assess the patient exposure risk, it will be necessary to determine the extraction amount of plasticizer per gram of PVC in clinical conditions. This study is particularly necessary for medical devices used for vascular access. One objective of the ARMED project is to propose a migration simulation model (Bernard et al. 2015). Indeed, the SCENIHR 2015 reported different migration

profiles between the plasticizers. Due to the primary metabolites toxicities of several DEHP-alternative (**MEHT**, **MINP**, **MINCH** and **MMeOCH**), it seems also appropriate to check the presence and to study the toxicities of their secondary metabolites.

Declaration of interest

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

References

W. A. Anderson, L. Castle, S. Hird, J. Jeffery, M. J. Scotter. 2011. A twenty-volunteer study using deuterium labelling to determine the kinetics and fractional excretion of primary and secondary urinary metabolites of di-2-ethylhexylphthalate and di-iso-nonylphthalate. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2022-2029.

L. Bernard, R. Cuff, M. Chagnon, F. Abdoulouhab, B. Décaudin, C. Breysse, S. Kauffmann, B. Cosserant, B. Souweine, V. Sautou, ARMED study group. 2015. Migration of plasticizers from PVC medical devices: Development of an infusion model. *Int. J. Pharm.* 15, 494, 136-145.

J. Borch, O. Ladefoged, U. Hass, A. M. Vinggaard. 2004. Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. *Reprod. Toxicol.* 18, 1, 53-61.

D. Bourdeaux, M. Yessaad, P. Chennell, V. Larbre, T. Eljezi, L. Bernard, V. Sautou, ARMED study group. 2016. Analysis of PVC plasticizers in medical devices and infused solutions by GC-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 118, 206-213.

E. Campioli, T.B.Duong, F. Deschamps, V. Papadopoulos. 2015. Cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid diisononyl ester and metabolite effects on rat epididymal stromal vascular fraction differentiation of adipose tissue. *Environ. Res.* 140, 145–156.

CERHR, (Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction) NTP-CERHR Expert

Panel Update on the Reproductive and Developmental Toxicity of Di(2-ethylhexyl)phthalate. 2005.

J. A. Cisneros, E. Björklund, I. González-Gil, Y. Hu, A. Canales, F. J. Medrano, A. Romero, S. Ortega-Gutiérrez, C. J. Fowler, M. L. López-Rodríguez. 2012. Structure-activity relationship of a new series of reversible dual monoacylglycerol lipase/fatty acid amide hydrolase inhibitors *J. Med. Chem.* 55, 824-836.

J. A. Deyo. 2008. Carcinogenicity and chronic toxicity of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHT) following a 2-year dietary exposure in Fischer 344 rats. *Food Chem. Toxicol.* 46(3), 990-1005.

ECB, (European Chemical Bureau) European Union Risk Assessment Report for Bis(2-ethylhexyl)phthalate. consolidated final report, 2004.

European Union, DIRECTIVE 2007/47/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL amending Council Directive 90/385/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to active implantable medical devices, Council Directive 93/42/EEC concerning medical devices and Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market.5 September 2007.

EC (European Union, R., The European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation 2008. 1272 / 2008.

NF EN 10993-5 Cytotoxicity assay. 2009.

NF EN 10993 Biological evaluation of medical devices. 2009.

French law n° 2012-1442 of december 24,2012 to the suspension of the manufacture, import, export and placing on the market of any specializing in food packaging containing bisphenol A Journal Officiel de la République Française. 0300(26 décembre 2012): p. 20395.

Frederiksen H.,Skakkebaek N.E., Andersson A.M. Metabolism of phthalates in humans. Mol.Nutr.Food Res. (2007) 51, 899–911.

H. Fromme, A. Schütze, T. Lahrz, M. Kraft, L. Fembacher, S. Siewering, R. Burkardt, S. Dietrich, H.M. Koch, W. Völkel. 2016. Non-phthalate plasticizers in German daycare centers and human biomonitoring of DINCH metabolites in children attending the centers (LUPE 3). Int. J Hyg. Environ. Health. 219, 33-39.

Huber W.W., Grasl-Kraupp B., Schulte-Hermann R. 1996. Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. Crit. Rev. Toxicol. 26, 365–481.

Hurst C.H., Waxman D.J. 2003. Activation of PPAR alpha and PPAR gamma by environmental phthalate monoesters. Toxicol.Sci. 74, 297–308.

H. M. Koch, H. M. Bolt, R. Preuss, J. Angerer. 2005. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. Arch. Toxicol. 79 367-376.

H. M. Koch, J. Angerer. 2007. Di-iso-nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine after a single oral dose of deuterium-labelled DINP. Int. J Hyg. Environ. Health. 201, 9-19.

H. M. Koch, A. Schütze, C Pälme, J. Angerer, T. Brüning. 2013. Metabolism of the plasticizer and phthalate substitute diisononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) in humans after single oral doses. Arch. Toxicol. 87, 799–806.

J K. M. Kleeff, H Sawhney, M. Korc. 2000. Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. Int. J. Cancer 86,399-407.

K. M. Kransler, A. N. Bachman, R. H. McKee. 2012. A comprehensive review of intake estimates of diisononyl phthalate (DINP) based on indirect exposure models and urinary biomonitoring data. Regul. Toxicol. Pharmacol. 62, 2, 248-256.

- S. Lakshmi, A. Jayakrishnan. 1998. Migration resistant, blood-compatible plasticized polyvinyl chloride for medical and related application. *Artif. Organs* 22, 222-229.
- E.K. Maloney, D.J. Waxman. 1999. Trans-Activation of PPAR alpha and PPAR gamma by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 161, 209–218.
- Martis, Leo; Freid, E.; Woods, E. 1987. Tissue distribution and excretion of tris-(2-ethylhexyl) trimellitate in rats. *J. of Toxicol. Environ. Health* 20, 4, 357-366.
- K. Miyata, K. Shiraishi, S. Houshuyama, N. Imatanaka, T. Umano, Y. Minobe, K. Yamasaki. 2006. Subacute oral toxicity study of di(2-ethylhexyl)adipate based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline no. 407". *Arch Toxicol.* 80, 4, 181-186.
- F. Nuti, S. Hildenbrend, M. Chelli, R. Wodarz, A. M. Papini. 2006. Synthesis of DEHP metabolites as biomarkers for GC-MS evaluation of phthalates as endocrine disrupters. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 3461-3465.
- P.J. Patynaa, R.P. Brownb, R.A. Davib, D.J. Letinskib, P.E. Thomasa, K.R. Coopera, T.F. Parkertonb. 2006. Hazard evaluation of diisononyl phthalate and diisodecyl phthalate in a Japanese medaka multigenerational assay; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 1, 36-47.
- Réglémentation REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals). Juin 2007.
- N. N. Reddy, Y. M. Mohan, K. Varaprasad, S. Ravindra, K. Vimala, K. M. Raju. 2010. Surface Treatment of Plasticized Poly(vinyl chloride) to Prevent Plasticizer Migration *J. Appl. Polym. Sci.* 115, 1589-1597.
- SCENIHR, (Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks) opinion on the safety of medical devices containing dehp- plasticized pvc or other plasticizers on Neonates and other groups possibly at risk (2015 update).
- Schütze, C. Pälme, J. Angerer, T. Weiss, T. Brüning, H. M. Koch. 2012. Quantification of biomarkers of environmental exposure to di(isononyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) in urine via HPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 895-896, 123-130.
- A. Schütze, M. Kolossa-Gehring, P. Apel, T. Brüning, H. M. Koch. 2014. Entering markets and bodies: increasing levels of the novel plasticizer Hexamoll® DINCH® in 24 h urine samples from the German Environmental Specimen Bank. *Int J Hyg Environ Health.* 217, 421-426.
- A. Schütze, M. Lorber, K. Gawrych, M. Kolossa-Gehring, P. Apel, T. Brüning, H. M. Koch. 2015. Development of a multi-compartment pharmacokinetic model to characterize the exposure to Hexamoll® DINCH®. *Chemosphere.* 128, 216-224.
- E. D. Van Vliet, E. D. Reitano, J. S. Chhabra, G. P. Bergen, R. M. Whyatt. 2001. A review of alternatives to di (2-ethylhexyl) phthalate-containing medical devices in the neonatal intensive care unit. *J. Perinatol.* 31, 551–560.

W. Wang, Z. R. Craig, M. S. Basavarajappa, R. K. Gupta, J. A. Flaws. 2012. Di (2-ethylhexyl) phthalate inhibits growth of mouse ovarian antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 258, 288-295.

U. Wirtzner, U. Rickenbacher, A. Katerkamp, A. Schachtrupp. 2011. Systemic toxicity of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHT) in rodents following four weeks of intravenous exposure. *Toxicol Lett.* 205, 1, 8-14.

1. Tests de cytotoxicité du DEHP et de ses plastifiants alternatifs

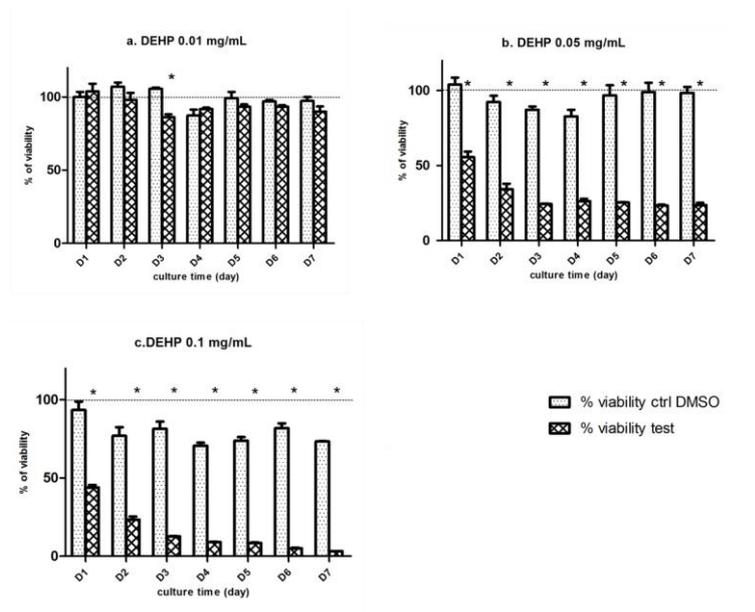


Figure 18 : Test de cytotoxicité du DEHP aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

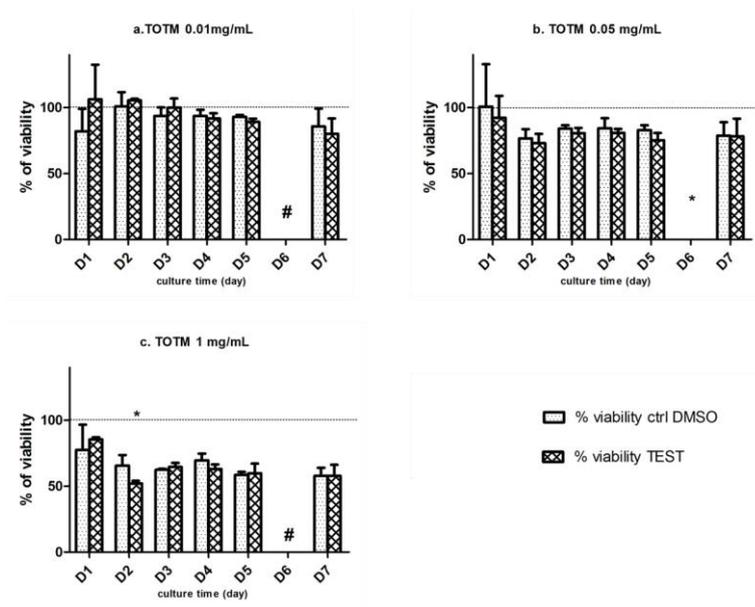


Figure 19 : Test de cytotoxicité du TOTM aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

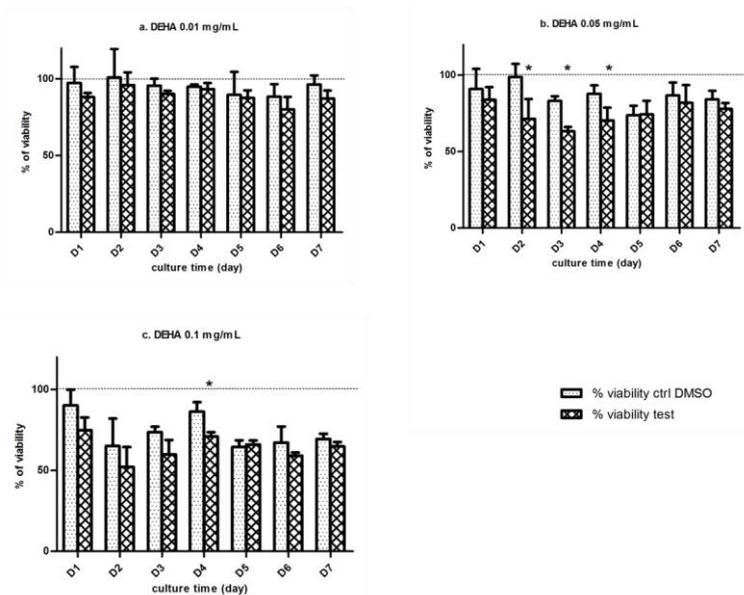


Figure 20: Test de cytotoxicité du DEHA aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

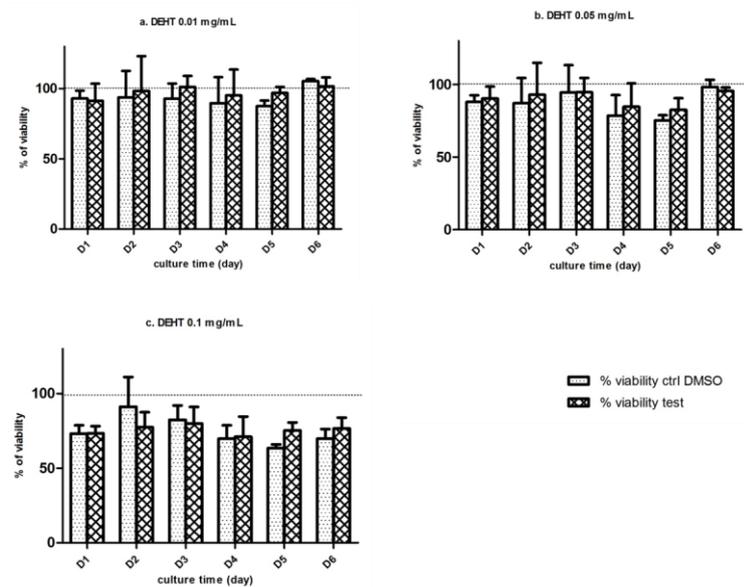


Figure 21 : Test de cytotoxicité du DEHT aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

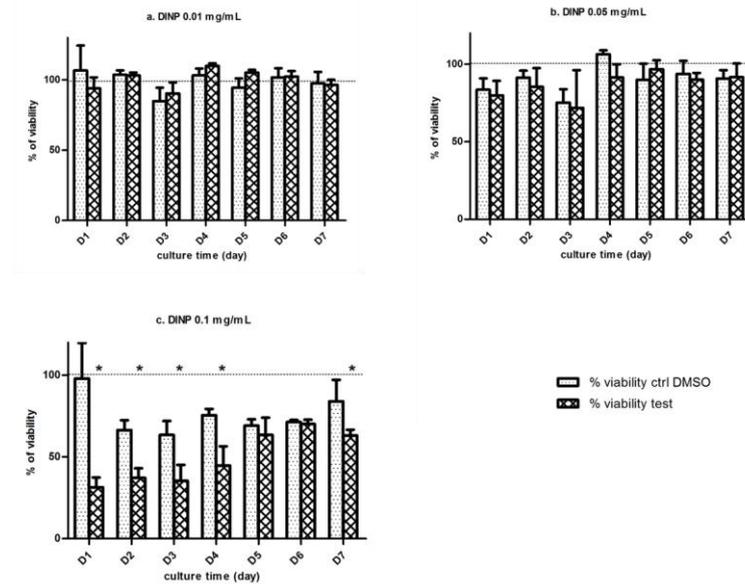


Figure 22 : Test de cytotoxicité du DINP aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

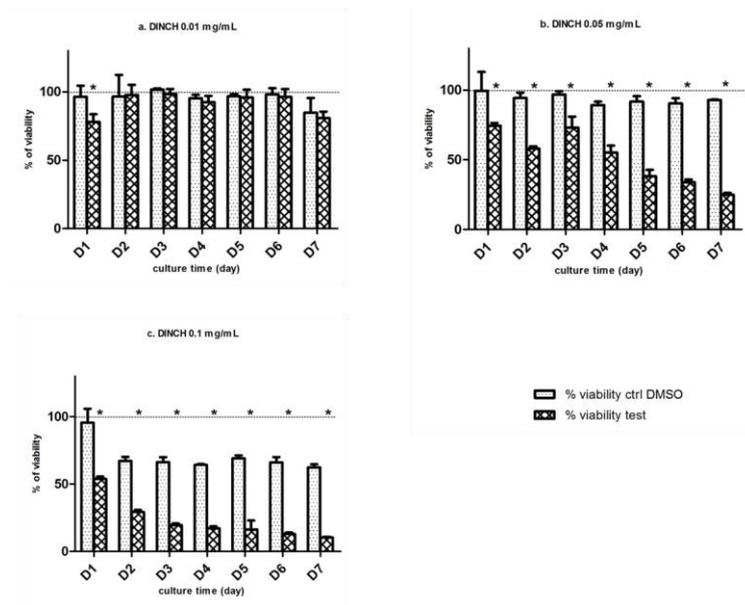


Figure 23 : Test de cytotoxicité du DINCH aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

2. Tests de cytotoxicité des métabolites primaires du DEHP et de ses plastifiants alternatifs

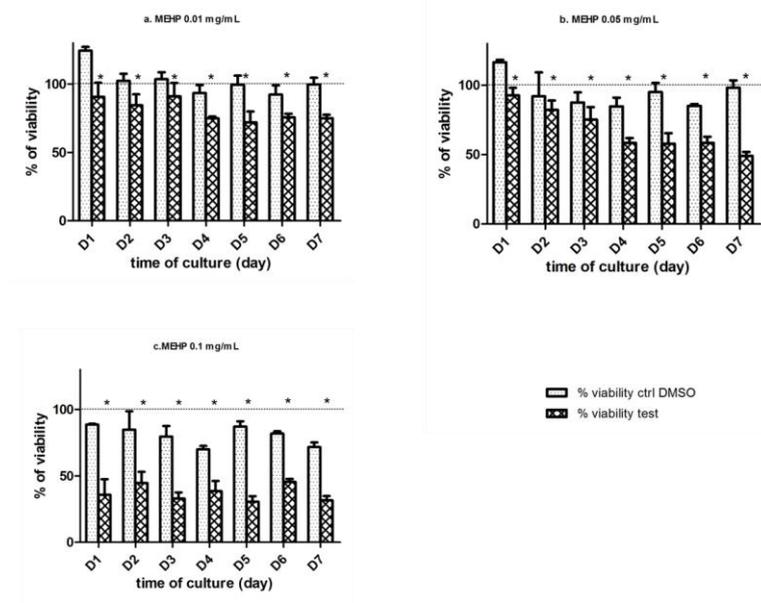


Figure 24 : Test de cytotoxicité du MEHP aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

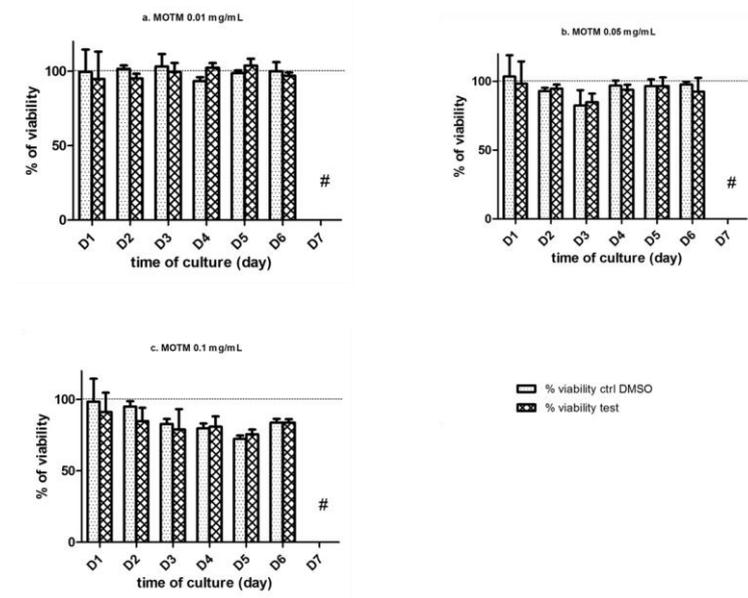


Figure 25 : Test de cytotoxicité du MOTM aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

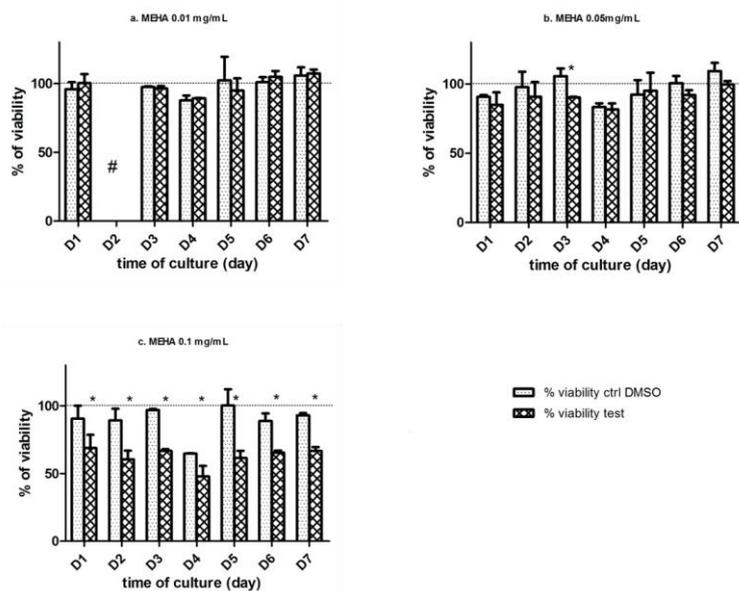


Figure 26 : Test de cytotoxicité du MEHA aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

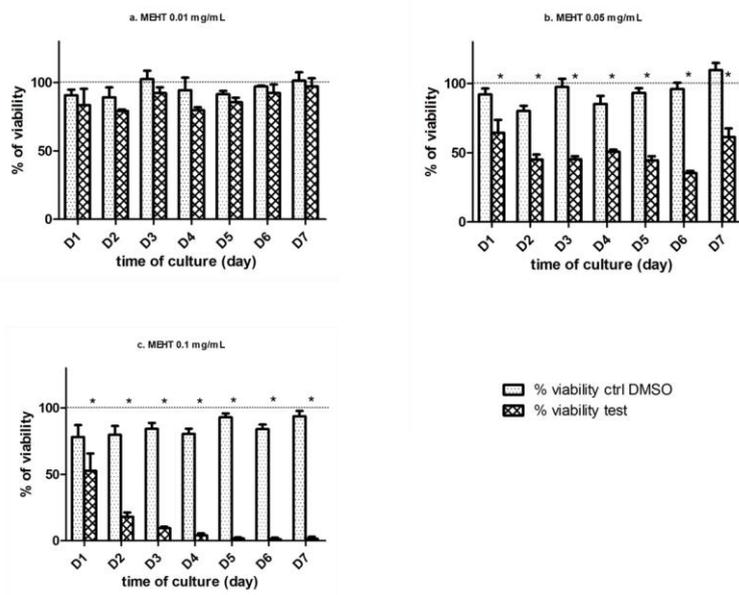


Figure 27 : Test de cytotoxicité du MEHT aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

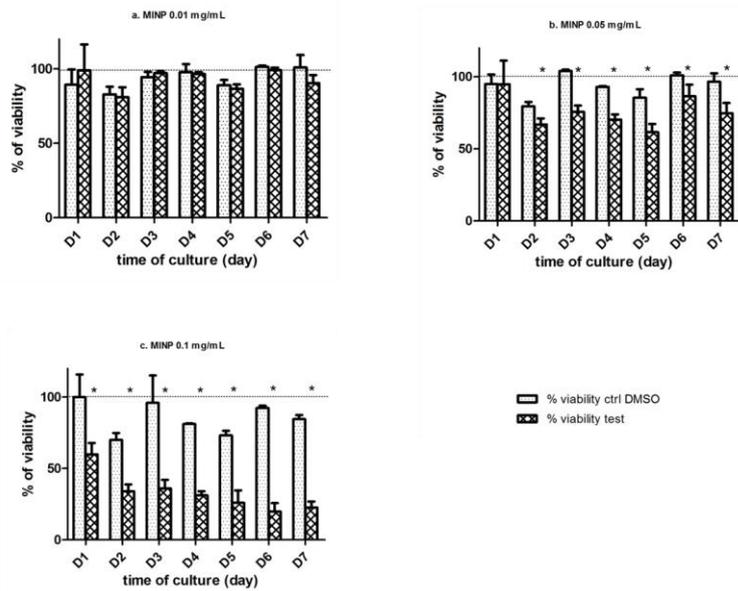


Figure 28 : Test de cytotoxicité du MINP aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

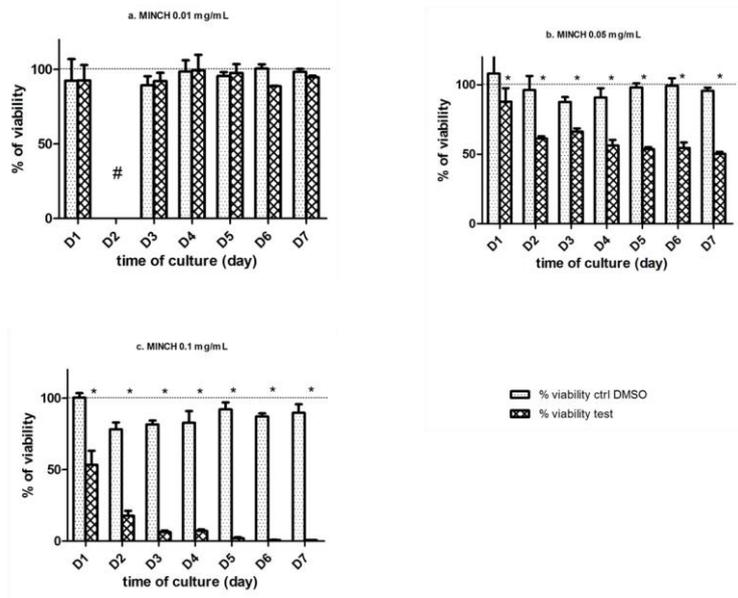


Figure 29 : Test de cytotoxicité du MINCH aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

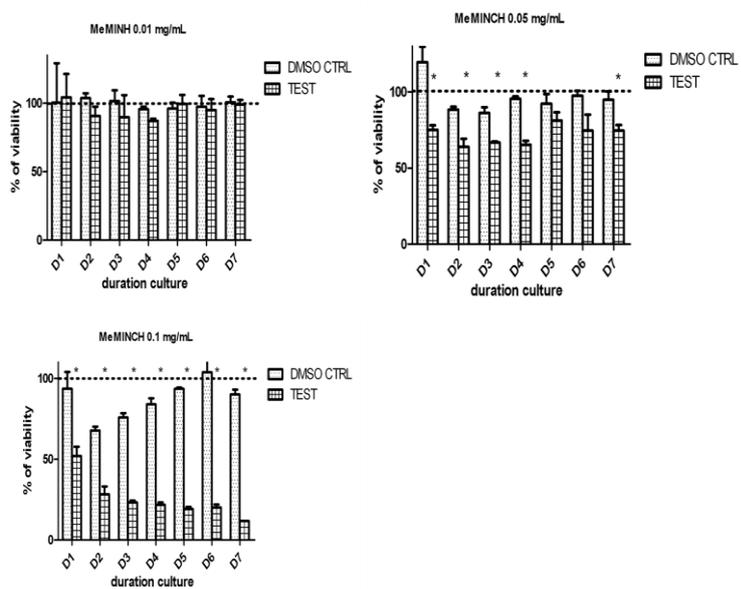


Figure 30 : Test de cytotoxicité du MeMOCH aux concentrations 0.01 mg/mL (a), 0.05 mg/mL (b) et 0.1 mg/mL (c) de J1 à J7.

Nom – Prénoms : PINTA Pierre Gabriel

Titre de la thèse : Etude de biocompatibilité des plastifiants alternatifs au DEHP et de leurs métabolites primaires.

Résumé de la thèse :

De part ses excellentes propriétés mécaniques qu'il confère au Polyvinyl chloride (PVC), le di-2-ethylhexyle phtalate (DEHP) est le plastifiant le plus utilisé dans la fabrication des dispositifs médicaux en PVC plastifié. En clinique, sous certaines conditions, le DEHP peut migrer de la matrice du dispositif médical vers les solutions qu'il contient ou véhicule. Le DEHP a été classé comme substance Cancérogène, Mutagène et Reprotoxique classe 1B par la réglementation CLP (Classification, Labeling and packaging) des substances dangereuses de 2008. Il est donc nécessaire de trouver une alternative à son utilisation. Dans cette optique, le projet pluridisciplinaire ARMED (Assessment and Risk Management of Medical Devices in plasticized polyvinylchloride) a été retenu par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé). L'objectif principal de ce projet est la gestion des risques liés à l'utilisation des dispositifs médicaux en PVC plastifié au DEHP. Des plastifiants alternatifs d'origine phtaliques et non phtaliques ont été retenus. Ce travail s'intègre dans le projet ARMED et a pour objectifs les études de cytotoxicité des plastifiants alternatifs au DEHP.

MOTS CLÉS : *Dispositif médical, PVC, DEHP, biocompatibilité, cytotoxicité, ARMED.*

JURY

PRÉSIDENT : Dr Antoine DUPUIS, MCU-PH, Faculté de Pharmacie de Poitiers

ASSESEURS : Pr Gaël GRIMANDI, PU-PH, Faculté de Pharmacie de Nantes

Dr Emmanuelle OLIVIER, Pharmacienne PH, CHU Nantes

Dr Nicolas PREVOST, Pharmacien assistant spécialiste, CHU Nantes

Adresse de l'auteur :