

anses

agence nationale de sécurité sanitaire  
alimentation, environnement, travail



*Connaître, évaluer, protéger*

## Elaboration d'une VTR par voie orale basée sur des effets reprotoxiques pour le Diisobutyl phtalate (DIBP)

Avis de l'Anses  
Rapport d'expertise collective

Juillet 2017

Édition scientifique





**anses**

agence nationale de sécurité sanitaire  
alimentation, environnement, travail



*Connaître, évaluer, protéger*

# Elaboration d'une VTR par voie orale basée sur des effets reprotoxiques pour le Diisobutyl phtalate (DIBP)

Avis de l'Anses

Rapport d'expertise collective

Juillet 2017

Édition scientifique



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 12 juillet 2017

## **AVIS** **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

**relatif à « l'élaboration de VTR reprotoxiques par voie orale pour 3 phtalates : le phtalate de diisobutyle (DIBP), le phtalate de diisooctyle (DIOP) et le phtalate de di-n-octyle (DnOP)»**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont publiés sur son site internet.*

---

L'Anses s'est autosaisie le 9 juin 2015 pour réaliser les expertises suivantes : élaboration d'une valeur toxicologique de référence (VTR) reprotoxique par voie orale pour les substances chimiques suivantes : le phtalate de diisobutyle (DIBP) (CAS 84-69-5), le phtalate de diisooctyle (DIOP) (CAS 27554-26-3) et le phtalate de di-n-octyle (DnOP) (CAS 117-84-0).

### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

Une valeur toxicologique de référence, ou VTR, est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Anses, 2015a).

En pratique, la construction de la VTR à seuil comprend les quatre étapes suivantes :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ;
- application de facteurs d'incertitude à la dose critique pour tenir compte des incertitudes.

L'élaboration des VTR suit une approche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes.

Le présent avis fait suite aux travaux d'expertise de l'Agence sur les phtalates ayant donné lieu à un rapport publié en 2015 (Anses, 2015a, b et c), en réponse à une saisine de la Direction générale de la santé de juin 2009 (2009-SA-0331) relative aux substances reprotoxiques de catégorie 2 et/ou perturbateurs endocriniens (P.E.). Ce rapport avait mis en évidence la nécessité de proposer une VTR reprotoxique pour le phtalate de diisobutyle (DIBP), le phtalate de diisooctyle (DIOP) et le phtalate de di-n-octyle (DnOP).

## **2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisé (CES) « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » et au groupe de travail « perturbateurs endocriniens » rattaché à ce CES, l'instruction de cette autosaisine. Les travaux ont été présentés au CES entre janvier 2016 et mars 2017. Ils ont été adoptés par le CES réuni le 30 mars 2017.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

## **3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES**

### **■ Phtalate de diisobutyle (DIBP) - CAS n°84-69-5**

- Toxicocinétique

Peu de données sont disponibles sur le DIBP. Une étude chez le rat exposé au DIBP par voie cutanée indique une absorption importante par voie cutanée ou percutanée et une élimination dans les urines et les fèces, sans accumulation significative dans les organes. Les principaux métabolites retrouvés chez l'Homme sont le MIBP (monoisobutyl phtalate) et le OH-MIBP (3OH-mono-méthylpropyl phtalate) (CPSC, 2011 ; Anses, 2015c).

- Toxicité

Seuls les effets sur la reproduction et le développement ont été analysés, l'objectif étant de proposer une VTR reprotoxique pour le DIBP. Parmi les études disponibles, deux études de bonne qualité exposant des rates gestantes au DIBP ont montré une mortalité fœtale, une altération du système reproducteur, un retard pubertaire et une rétention des mamelons chez les descendants mâles (Saillenfait *et al.*, 2006 & 2008). Ces effets sont également régulièrement décrits dans des études animales avec des phtalates de chaîne moyenne et ont d'ailleurs conduit pour certains de ces composés, dont le DIBP, à leur classification harmonisée au niveau européen comme substance reprotoxique de catégorie 1B par le comité d'évaluation des risques de l'Agence

européenne des produits chimiques (ECHA). A ce jour, les données chez l'Homme restent contradictoires.

- Construction de la VTR
  - Choix de l'effet critique

Le jeu d'études actuellement disponible sur le DIBP est relativement limité, notamment en termes de niveaux de doses, de durées d'exposition et d'effets analysés. Ainsi, la substance n'a pas été testée à des doses inférieures à 100 mg/kg/j. On ne peut exclure que certains effets critiques puissent apparaître à des doses plus faibles. Par conséquent, la construction d'une VTR sur la base des données spécifiques au DIBP présenterait beaucoup d'incertitudes.

Au vu des similarités structurales, physicochimiques et toxicologiques entre le DIBP et le DnBP (phtalate de n-dibutyle, CAS 84-74-2), les experts du CES considèrent que le DIBP pourrait induire des effets comparables aux DnBP dans les mêmes conditions. Même s'il semble y avoir des différences de toxicité entre ces deux substances, celles-ci sont considérées comme mineures au vu des résultats de l'étude de Saillenfait *et al.* (2008). Par conséquent, la lecture croisée entre le DIBP et le DnBP a été jugée pertinente par le CES pour dériver une VTR reprotoxique pour le DIBP.

- Analyse des VTR existantes pour le DnBP et proposition de VTR pour le DIBP

**Plusieurs VTR reprotoxiques pour le DnBP ont été retrouvées dans la littérature. La VTR du DnBP construite par l'Afsset (2009) a été jugée pertinente par les experts du CES et a donc été retenue comme VTR pour le DIBP.**

**Tableau 1 : VTR reprotoxique pour le DnBP**

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR
Diminution spermatocytaire et dysplasies mamelonnaires observés dans la descendance	LOAEL <sup>1</sup> = 2 mg/kg/j	1000	<b>VTR = 0,002 mg/kg/j</b>
			<b>Niveau de confiance :</b> Recueil de données : fort Etude : moyen (incertitude +) Dose critique : moyen (absence de NOAEL) VTR : moyen
Etude de toxicité prénatale orale chez le rat Sprague-Dawley (GD15-PND21)	Absence de NOAEL <sup>2</sup> BMDL <sup>3</sup> peu pertinente	UF <sub>A</sub> : 10 UF <sub>H</sub> : 10 UF <sub>L</sub> : 10	
Lee <i>et al.</i> , 2004			

**En conclusion : la VTR du DnBP élaborée par l'Afsset (2009) est 0,002 mg/kg/j et est considérée comme applicable au DIBP.**

<sup>1</sup> Lowest Observed Adverse Effect Level (= Dose minimale entraînant un effet néfaste observé)

<sup>2</sup> No Observed Adverse Effect Level (= Dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)

<sup>3</sup> Limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose

Tableau 2 : VTR reprotoxique pour le DIBP

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR
Diminution spermatocytaire et les lésions dysplasiques mamelonnaires observées avec le DnBP  Lee <i>et al.</i> , 2004	LOAEL = 2 mg/kg/j	1000	VTR = 0,002 mg/kg/j
		UF <sub>A</sub> : 10 UF <sub>H</sub> : 10 UF <sub>B/L</sub> : 10	Niveau de confiance : moyen

- Niveau de confiance

Le niveau de confiance global a été attribué à la VTR reprotoxique du DIBP par voie orale en se basant sur les critères suivants :

- Niveau de confiance dans la nature et la qualité des données : **moyen** ; considérant que la VTR du DIBP est basée sur une lecture croisée avec le DnBP.
- Niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et le mode d'action : **fort** ; au vu des connaissances sur les phtalates, les effets critiques retenus sont jugés pertinents et semblent être particulièrement sensibles. Les effets sont cohérents avec les mécanismes d'action de reprotoxicité imputables aux phtalates. Enfin, ces effets sont jugés transposables à l'Homme.
- Niveau de confiance dans le choix de l'étude clé : **moyen** ; considérant l'absence de NOAEL et une durée d'exposition restreinte du 15<sup>ème</sup> jour de gestation au 21<sup>ème</sup> jour post-natal.
- Niveau de confiance dans le choix de la dose critique : **moyen** ; considérant l'utilisation d'un LOAEL.

**Le niveau de confiance global pour cette VTR est donc moyen.**

Le CES rappelle que, concernant les effets sur le développement, il est généralement admis qu'une exposition unique peut suffire pour induire la survenue de l'effet si l'exposition survient lors d'une phase critique du développement embryo-fœtal. Ce type de VTR est applicable pour des durées d'exposition courtes (quelques heures à quelques jours).

#### ■ Phtalate de diisooctyle (DIOP) - CAS n°27554-26-3

- Toxicocinétique

Les données expérimentales dans différentes espèces animales montrent que le DIOP est bien absorbé par voie orale. D'après une étude sur volontaires exposés à un mélange de phtalates dont le DIOP, des monoesters du DIOP étaient excrétés en 24 heures dans les urines. Les métabolites retrouvés chez des rats recevant du DIOP par gavage sont le mono-(3-carboxypropyl) phtalate (MCPP), le mono-n-octyl phtalate (MnOP) et le mono-(3-méthyl-5-diméthylhexyl) phtalate (MiNP). Cependant, la présence de MCPP et le MnOP pourraient en fait provenir d'une contamination par du DnOP (CPSC, 2011).

- Toxicité

Seuls les effets sur la reproduction et le développement ont été analysés, l'objectif étant de proposer une VTR reprotoxique pour le DIOP. Parmi les études disponibles, une étude de bonne qualité exposant des rates gestantes au DIOP (Saillenfait *et al.*, 2013) a montré une diminution du poids fœtal, des variations squelettiques, une mortalité fœtale et une altération du système reproducteur chez les descendants mâles. Ces effets sont également fréquemment décrits dans des études animales avec des phtalates de chaîne moyenne et ont d'ailleurs conduit pour certains, dont le DIBP, le DnBP (phtalate de dibutyle), le DEHP (phtalate de di-(2-éthylhexyle)), le DnPP (phtalate de di-n pentyle) ou le DnHP (phtalate de di-n-hexyle), à leur classification harmonisée au niveau européen comme substance reprotoxique de catégorie 1B par le comité d'évaluation des risques de l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA). Concernant le DIOP, une proposition de classification en tant que reprotoxique de catégorie 1B a été soumise par la France en 2016 à l'ECHA. Le comité d'évaluation des risques devrait se prononcer sur cette proposition en 2017 ou 2018. A ce jour, les données chez l'Homme restent contradictoires.

- Construction de la VTR
  - Choix de l'effet critique

Le jeu d'études actuellement disponible sur le DIOP est très limité en termes de niveaux de doses, de durées d'exposition et d'effets analysés. Ainsi, la construction d'une VTR sur la base des données spécifiques au DIOP présenterait beaucoup d'incertitudes.

Au vu des similarités toxicologiques entre le DnBP et le DIOP, les experts du CES considèrent que le DIOP pourrait induire des effets comparables au DnBP dans les mêmes conditions mais à des doses deux fois plus élevées. Par conséquent, une lecture croisée entre le DIOP et le DnBP a été jugée pertinente par le CES pour dériver une VTR reprotoxique pour le DIOP après ajustement de leur toxicités respectives.

- Analyse des VTR existantes pour le DnBP et proposition de VTR pour le DIOP

**Plusieurs VTR reprotoxiques pour le DnBP ont été retrouvées dans la littérature. La VTR du DnBP construite par l'Afsset (2009) a été jugée pertinente par les experts du CES et a donc été retenue comme base pour la construction de la VTR pour le DIOP.**

**Tableau 3 : VTR reprotoxique pour le DnBP**

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

**En conclusion : la VTR du DnBP élaborée par l'Afsset (2009) est 0,002 mg/kg/j. Après ajustement, la VTR du DIOP est 0,004 mg/kg/j.**

Tableau 4 : VTR reprotoxique pour le DIOP

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR
Diminution spermatocytaire et les lésions dysplasiques mamelonnaires observées avec le DnBP  Lee <i>et al.</i> , 2004	LOAEL <sub>DnBP</sub> = 2 mg/kg/j	1000	<b>VTR = 0,004 mg/kg/j</b>
	LOAEL <sub>DIOP</sub> = 4 mg/kg/j (après prise en compte de la différence de toxicité entre le DIOP et le DnBP)	UF <sub>A</sub> : 10 UF <sub>H</sub> : 10 UF <sub>B/L</sub> : 10	<b>Niveau de confiance : moyen</b>

- Niveau de confiance

Le niveau de confiance global a été attribué à la VTR reprotoxique du DIOP par voie orale en se basant sur les critères suivants :

- Niveau de confiance dans la nature et la qualité des données : **moyen** ; considérant que la VTR du DIOP est basée sur une lecture croisée avec le DnBP.
- Niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et le mode d'action : **fort** ; au vu des connaissances sur les phtalates, les effets critiques retenus sont jugés pertinents et semblent être particulièrement sensibles. Les effets sont cohérents avec les mécanismes d'action de reprotoxicité imputables aux phtalates. Enfin, ces effets sont jugés transposables à l'Homme.
- Niveau de confiance dans le choix de l'étude clé : **moyen** ; considérant l'absence de NOAEL et une durée d'exposition restreinte du 15<sup>ème</sup> jour de gestation au 21<sup>ème</sup> jour postnatal.
- Niveau de confiance dans le choix de la dose critique : **moyen** ; considérant l'utilisation d'un LOAEL.

**Le niveau de confiance global pour cette VTR est donc moyen.**

Le CES rappelle que, concernant les effets sur le développement, il est généralement admis qu'une exposition unique peut suffire pour induire la survenue de l'effet si l'exposition survient lors d'une phase critique du développement embryo-fœtal. Ce type de VTR est applicable pour des durées d'exposition courtes (quelques heures à quelques jours).

#### ■ Phtalate de di-n-octyle (DnOP)- CAS n°117-84-0

- Toxicocinétique

L'absorption orale du DnOP est très peu décrite dans la littérature. Elle est néanmoins supposée rapide. Le DnOP est métabolisé en MnOP (mono-n-octyl phtalate) et n-octanol après hydrolyse *via* des estérases. Le n-octanol est ensuite oxydé en acide gras. Le MnOP est oxydé en MCPP (mono-(3-carboxypropyl)phtalate) mais aussi en d'autres composés mineurs tels que le MCMP (mono-carboxymethylphtalate), le MCPeP (mono-(5-carboxy-n-pentyl)phtalate), le MCHpP (mono-(7-carboxy-n-heptyl)phtalate), des isomères du MOOP (mono-oxo-n-octyl phtalate) tel que le mono-(7-oxo-n-octyl)phtalate et en acide phtalique. Le MnOP et ses métabolites oxydés sont

ensuite conjugués à l'acide glucuronique. Le DnOP n'est retrouvé ni dans les urines ni dans les faeces. Le principal métabolite retrouvé dans les urines est le MCP (CPSC, 2010).

- Toxicité

Seuls les effets sur la reproduction et le développement ont été analysés, l'objectif étant de proposer une VTR reprotoxique pour le DnOP. Parmi les études disponibles, une étude de bonne qualité exposant des rates gestantes au DnOP (Saillenfait *et al.*, 2011) a montré des anomalies du squelette ainsi que des effets au niveau du foie (augmentation des enzymes hépatiques et diminution de poids).

- Construction de la VTR

- Choix de l'effet critique

L'étude de Saillenfait *et al.* (2011) ne présente pas de biais méthodologique cependant les observations faites sont essentiellement d'ordre morphologique et l'étude s'arrête à la fin de la vie fœtale sans suivi postnatal. Elle permet d'identifier un LOAEL de 250 mg/kg/j pour le DnOP avec comme effet observé la présence d'une côte lombaire surnuméraire. Sachant que ce type de malformation peut être fréquent chez le rat, lié à différents facteurs déterministes et être réversible, ce type d'anomalie peut être considéré comme normal par rapport au processus développemental et n'avoir le plus souvent aucune incidence sur la santé. Ainsi, cet effet n'a pas été jugé approprié par les experts pour dériver une VTR pour cette substance.

De plus, contrairement à d'autres phtalates (en particulier de chaîne moyenne), le DnOP ne semble pas induire d'effet sur le système endocrinien. Cependant, il faut noter le peu d'études ayant investigué ce type d'effets sur le DnOP dans la littérature.

**En conclusion, aucune VTR reprotoxique n'est proposée pour le DnOP.**

Le CES recommande de réaliser des études toxicologiques sur le DnOP afin de pouvoir construire une VTR pour ce composé.

En raison de la présence massive et diffuse des phtalates, la construction d'une VTR reprotoxique pour d'autres phtalates devrait être élaborée, si besoin par lecture croisée.

#### 4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du CES « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » qui portent sur l'élaboration de valeurs toxicologiques de référence reprotoxique par voie orale pour les phtalates évalués.

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR
<b>DIBP</b>			
Diminution spermatocytaire et les lésions dysplasiques mamelonnaires observées avec le DnBP (Lee <i>et al.</i> , 2004)	LOAEL = 2 mg/kg/j	1000	<b>VTR = 0,002 mg/kg/j</b>
		UF <sub>A</sub> : 10 UF <sub>H</sub> : 10 UF <sub>B/L</sub> : 10	<b>Niveau de confiance : moyen</b>
<b>DIOP</b>			
Diminution spermatocytaire et les lésions dysplasiques mamelonnaires observées avec le DnBP (Lee <i>et al.</i> , 2004)	LOAEL <sub>DnBP</sub> = 2 mg/kg/j	1000	<b>VTR = 0,004 mg/kg/j</b>
	LOAEL <sub>DIOP</sub> = 4 mg/kg/j (après prise en compte de la différence de toxicité entre le DIOP et le DnBP)	UF <sub>A</sub> : 10 UF <sub>H</sub> : 10 UF <sub>B/L</sub> : 10	<b>Niveau de confiance : moyen</b>
<b>DnOP</b>			
Aucune VTR reprotoxique n'est proposée			

Dr Roger Genet

#### MOTS-CLÉS

Valeur toxicologique de référence, VTR, reprotoxicité, perturbation endocrinienne, DIBP, DIOP, DnOP, phtalates, oral

Toxicological reference value, reprotoxicity, endocrine disruption, DIBP, DIOP, DnOP, phthalates, oral route

---

## **Valeurs toxicologiques de référence (VTR)**

**Elaboration d'une VTR par voie orale basée sur des effets reprotoxiques pour le Diisobutyl  
phtalate (DIBP) (CAS n°84-69-5)**

---

**Mission permanente « Valeurs toxicologiques de référence »**

**Saisine n°2015-SA-0133  
Saisine liée « n°2009-SA-0331 »**

**RAPPORT**

**d'expertise collective**

**Comité d'experts spécialisé**

**« Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence »**

**Groupe de travail « perturbateurs endocriniens »**

**Mars 2017**

## Mots clés

---

Valeur toxicologique de référence, VTR, reprotoxicité, perturbation endocrinienne, DIBP, phtalates, oral  
Toxicological reference value, reprotoxicity, endocrine disruption, DIBP, phthalates, oral route

## Présentation des intervenants

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

### GROUPE DE TRAVAIL

---

#### Président

M. Claude EMOND – Université de Montréal, Canada

#### Vice-président

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

#### Membres

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

Mme Martine APPLANAT-Directeur de Recherche – INSERM.

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

M. Rémy BEAUDOUIN-Chargé de Recherche - INERIS.

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

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

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

Mme Cécile CHEVRIER –Chargé de Recherche -INSERM.

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

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

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

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

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

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

M. Christophe MINIER - Ecotoxicologue - Université du Havre

M. Luc MULTIGNER - Médecin épidémiologiste – INSERM

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

M. Patrick THONNEAU - Médecin - INSERM

Mme Catherine VIGUIE – Vétérinaire – Directrice de Recherche INRA

---

#### COMITE D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

---

CES « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » - 14 janvier 2016, 10 mars 2016, 12 mai 2016, 07 juillet 2016, 20 octobre 2016, 8 décembre 2016, 12 janvier 2017

##### **Président**

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

##### **Vice-président**

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue chez Nexter Group – Médecine du travail, toxicologie, reprotoxicité

##### **Membres**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Mme Véronique MALARD – Ingénieur chercheur en toxicologie au CEA, Centre de Cadarache. Docteur es science – Toxicologie « in vitro », biologie cellulaire, nanotoxicologie, protéomique.

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue à l'Association Interentreprises pour la Santé au Travail 19

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

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

M. Alain SIMONNARD – Pharmacien toxicologue, ERT, retraité de l'INRS

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

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

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

#### **RAPPORTEURS**

---

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

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue chez Nexter Group – Médecine du travail, toxicologie, reprotoxicité

#### **PARTICIPATION ANSES**

---

##### **Coordination scientifique**

Mme Aurélie MATHIEU-HUART – Chef de projet scientifique - Anses

M. François POUZAUD – Chef de projet scientifique - Anses

##### **Contribution scientifique**

Mme Sandrine CHARLES – Chef de projet scientifique - Anses

M. François POUZAUD – Chef de projet scientifique - Anses

##### **Secrétariat administratif**

Mme Séverine BOIX-PETRE – Anses

## SOMMAIRE

<b>1.1</b>	<b>Contexte.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2</b>	<b>Objet de la saisine.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3</b>	<b>Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4</b>	<b>Prévention des risques de conflit d'intérêt .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Identification de la substance .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>Propriétés physico-chimiques .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3</b>	<b>Usages et exposition .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Toxicocinétique.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>Effets sur la reproduction et le développement.....</b>	<b>17</b>
3.2.1	Données chez l'Homme.....	17
3.2.2	Données chez l'animal.....	17
<b>3.3</b>	<b>Mécanismes d'action .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4</b>	<b>Extrapolation de l'animal à l'Homme .....</b>	<b>22</b>
<b>5.1</b>	<b>Choix de l'effet critique.....</b>	<b>26</b>
<b>5.2</b>	<b>Analyse des VTR existantes.....</b>	<b>30</b>
<b>5.3</b>	<b>Niveau de confiance.....</b>	<b>32</b>

## Sigles et abréviations

Afsset	Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation environnement travail
ARN	Acide RiboNucléique
ATSDR	Agency for Toxic substances and disease Registry
BMD	Benchmark Dose
BMDL	Limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose
CES	Comité d'Experts Spécialisés
CLH	Classification and Labelling Harmonized
CPSC	Consumer Product Safety Commission
CYP	Cytochrome
DAG	Distance anogénitale
DnBP	Di-n-Butyl phthalate
DIBP	DiisoButyl Phtalate
DIOP	DiisoOctyl Phtalate
DnOP	Di-n-octyl phtalate
ECHA	European CHemicals Agency (= Agence européenne des produits chimiques)
GT	Groupe de Travail
InsI3	Insuline like 3
JPC	Jour post-conception
JPN	Jour Post Natal
HEC	Concentration équivalent humaine (= Human Equivalent Concentration)
Hsd3b	hydroxy-delta-5 steroid dehydrogenase
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level (= Dose minimale entraînant un effet néfaste observé)
MIBP	MonolisoButyl Phtalate
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (= Dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)
NTP	National Toxicology Program
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
RAC	Risk Assessment Committee

---

Scarb1	Scavenger receptor class B member 1
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
SVHC	Substance of very high concern
UF	Facteur d'incertitude (= Uncertainty Factor)
UF <sub>A</sub>	Facteur d'incertitude inter-espèces
UF <sub>H</sub>	Facteur d'incertitude interindividuel
UF <sub>L</sub>	Facteur d'incertitude lié à l'utilisation d'un LOAEL ou d'une BMD
UF <sub>S</sub>	Facteur d'incertitude lié à la transposition subchronique à chronique
US EPA	United States Environmental Protection Agency (États-Unis)
VTR	Valeur Toxicologique de Référence

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Identification de la substance .....	12
Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques.....	13
Tableau 3 : Liste des études clés évaluant la reprotoxicité du DIBP .....	21
Tableau 4 : VTR reprotoxique existantes pour le DIBP.....	25
Tableau 5 : Comparaison des données physicochimiques du DnBP et du DIBP en vue d'une lecture croisée pour la dérivation d'une VTR reprotoxique .....	27
Tableau 6 : Comparaison des données de toxicité sur le développement du DnBP et du DIBP en vue d'une lecture croisée pour la dérivation d'une VTR reprotoxique.....	28
Tableau 7 : Comparaison des effets du DIBP et du DnBP sur la production de la testostérone et sur l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des stéroïdes .....	29
Tableau 8: VTR reprotoxiques existantes pour le DnBP.....	32
Tableau 9 : VTR reprotoxique pour le DIBP .....	34

## Liste des figures

<b>Figure 1 : Structure générale des phtalates</b> .....	12
Figure 2 :Principales voies métaboliques de phase I des phtalates chez les rongeurs et chez l'Homme (INSERM, 2011). <i>Les systèmes enzymatiques impliqués figurent en italiques.</i> .....	16
Figure 3 : Représentation des cibles cellulaires des phtalates incluant les modifications géniques et hormonales ainsi que les réponses au niveau des organes (Santé Canada, 2015) .....	22

# 1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

## 1.1 Contexte

Une valeur toxicologique de référence, ou VTR, est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Afsset, 2010).

En pratique, la construction de la VTR à seuil comprend les quatre étapes suivantes :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ;
- application de facteurs d'incertitude à la dose critique pour tenir compte des incertitudes.

L'élaboration des VTR suit une approche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes.

## 1.2 Objet de la saisine

Suite aux rapports synthétisant les données sur les phtalates (Anses, 2015a, b et c), l'Anses s'est auto-saisie pour proposer des VTR reprotoxiques par voie orale pour trois phtalates, le DIBP (diisobutyl phthalate), le DIOP (diisooctyl Phtalate) et le DnOP (di-n-octyl phtalate) pour lesquels des preuves d'exposition et des données de toxicité ont été recensées.

L'objectif de cette expertise est ainsi d'élaborer une VTR basée sur des effets reprotoxiques pour ces trois phtalates. Le présent rapport décrit uniquement l'élaboration de la VTR pour le DIBP. Des rapports séparés sont disponibles pour le DIOP et le DnOP. A noter également que l'Anses, en 2016, a soumis à l'ECHA (European CHemicals Agency) un dossier de classification sur les propriétés reprotoxiques du DIOP.

### 1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisé « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » (construction de la VTR) et au groupe de travail « perturbateurs endocriniens » rattaché à ce CES (réalisation du profil toxicologique et choix de l'effet critique), l'instruction de cette saisine.

Les travaux d'expertise du groupe de travail et des rapporteurs ont été soumis régulièrement au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Le rapport produit par le groupe de travail et les rapporteurs tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) »

### 1.4 Prévention des risques de conflit d'intérêt

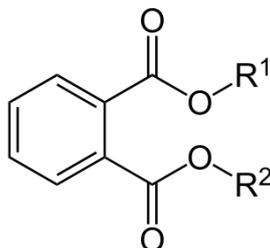
L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

## 2 Informations générales

### 2.1 Identification de la substance

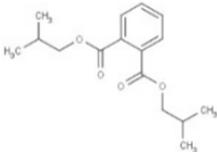
Le phtalate de diisobutyle (DIBP) fait partie de la famille des phtalates à chaîne moyenne qui sont des diesters de l'acide ortho-phtalique. La figure 1 présente la structure générale des phtalates.



*R1 et R2 sont les mêmes groupes aryles ou alkyles*

**Figure 1 : Structure générale des phtalates**

**Tableau 1 : Identification de la substance**

Nom	Phtalate de diisobutyle (DIBP)
Numéro CAS	84-69-5
Numéro EINECS	201-553-2
Synonymes	1,2-benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl)ester, diisobutyl phtalate
Formule	$C_{16}H_{22}O_4$ 

## 2.2 Propriétés physico-chimiques

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques

	DIBP
Forme physique	Liquide incolore
	HSDB (2009), ECHA (2009) et CSST (1990) cités dans Anses (2015a)
Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	278,35
	IPCS (2006), ECHA (2009) et CSST (1990) cités dans Anses (2015a)
Point d'ébullition (°C)	296,5 –327
	IPCS (2006), ECHA (2009), HSDB (2009), CSST (1990) et Chemical book cités dans Anses (2015a)
Point de fusion (°C)	-64 à -37
	HSDB (2009), IPCS (2006), ECHA (2009) et CSST (1990) cités dans Anses (2015a)
Pression de vapeur (Pa)	0,01 à 20°C
	6,35 x 10 <sup>-3</sup> à 25°C
	IPCS (2006), ECHA (2009) cités dans Anses (2015a)
Densité	Densité vapeur : 9,6
	Densité liquide : 1,05 à 15°C ; 1,04 à 20°C
	HSDB (2009), IPCS (2006) et CSST (1990) cités dans Anses (2015a)
Point d'éclair (°C)	Coupelle ouverte : 185
	Coupelle fermée : Non documenté
	HSDB (2009), IPCS (2006) et CSST (1990) cités dans Anses (2015a)
Solubilité dans l'eau (mg.L <sup>-1</sup> )	1 – 20 à 20°C
	6,2 à 24°C
	HSDB (2009), ECHA (2009) et IPCS (2006) cités dans Anses (2015a)
LogKow	4,11
	HSDB (2009) et ECHA (2009) cités dans Anses (2015a)

## 2.3 Usages et exposition

Le DIBP est produit et utilisé à hauteur de 10000 à 50000 tonnes par an en Europe. Il est majoritairement utilisé, en tant que plastifiants, qui par la suite sont mis en œuvre dans différents articles en caoutchouc, des colles, des aménagements intérieurs (revêtements de sol et de mur, câbles, rideaux de douches, tissus enduits..) des poches plastiques, des couvertures d'agendas (Anses, 2015a).

La population générale peut être exposée aux phtalates, incluant le DIBP, via différentes voies et sources. Principalement, l'exposition peut se faire par voie orale *via* des articles ou emballages en contact avec l'alimentation, par inhalation dans les environnements intérieurs et par voie cutanée lors de contact direct avec des articles traités (ECHA, 2016). L'étude française d'alimentation totale (EAT2, 2011) a permis

d'identifier la présence de DIBP dans les aliments tels que consommés en France. L'imprégnation de la population française au DIBP a également été documentée par les études de biosurveillance (Cohortes ELFE et EDEN-PELAGIE, Anses 2015b).

Réglementairement, le DIBP est concerné par (Anses, 2015a) :

- Le règlement (CE) n°1272/2008 (CLP) : le DIBP est classé reprotoxique de catégorie 1B – H360FD.
- Le règlement REACH (CE) n°1907/2006 : le DIBP fait partie de la liste des substances enregistrées avant le 1er décembre 2010, il est inscrit à l'annexe XIV de REACH relative à l'autorisation et est considéré comme « substance of very high concern » (SVHC).
- Le règlement (UE) n°10/2011 : le DIBP n'est pas autorisé dans les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.
- La directive 2007/47/CE : le DIBP fait l'objet de mesures spécifiques concernant son utilisation dans les dispositifs médicaux du fait de sa classification.
- Le règlement (CE) n°1223/2009 : le DIBP est interdit dans les produits cosmétiques depuis l'entrée en application de l'article 15 de ce règlement.

### 3 Synthèse des données toxicologiques

Seuls les effets sur la reproduction et le développement sont décrits dans ce profil toxicologique, l'objectif étant de proposer une VTR reprotoxique pour le DIBP.

#### 3.1 Toxicocinétique

Un schéma métabolique commun aux phtalates est décrit en figure 2 (INSERM, 2011).

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

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

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

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

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

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



Quelques données spécifiques au DIBP ont été trouvées dans la littérature (CPSC, 2011). Une étude chez le rat exposé au DIBP par voie cutanée a indiqué une absorption importante *via* la peau et une élimination dans les urines et les fèces, sans accumulation significative dans les organes (Elsisi *et al.*, 1989 cité dans CPSC, 2011). Une étude *in vitro* sur des estérases isolées murines et humaines a identifié le MIBP (monoisobutyl phtalate) comme métabolite du DIBP (Mentlein et Butte, 1989 cité dans CPSC, 2011). Chez l'Homme, le DIBP se métabolise principalement en MIBP mais aussi en OH-MIBP (3OH-mono-méthylpropyl phtalate) (Anses, 2015c ; Koch, 2012).

## 3.2 Effets sur la reproduction et le développement

### 3.2.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée disponible n'a été identifiée chez l'Homme pour le DIBP.

Cependant, des données sur d'autres phtalates sont disponibles et montrent que, chez l'Homme, certains phtalates ou leurs métabolites sont retrouvés dans les urines, le plasma sanguin et le liquide séminal. Certaines études épidémiologiques ont montré une relation possible entre certains métabolites de phtalates et des malformations congénitales. Cependant, d'une manière générale, les preuves sont limitées pour conclure à l'existence d'un rôle des phtalates sur la survenue des anomalies de l'appareil génital (hypospadias, cryptorchidie), ainsi que sur le risque de puberté précoce (en particulier chez la femme).

Plusieurs études chez l'Homme retrouvent une association entre les concentrations de phtalates et une altération des paramètres spermatiques (concentration et la morphologie des spermatozoïdes) ainsi qu'une augmentation de la fragmentation de l'ADN du gamète mâle. Cependant, d'autres études ne retrouvent pas d'effets des phtalates sur les paramètres spermatiques.

**En conclusion, les effets des phtalates sur le système reproducteur masculin ne peuvent être considérés comme avérés sur la base des données épidémiologiques analysées** (Anses, 2015c).

### 3.2.2 Données chez l'animal

Les effets du DIBP sur le développement après une exposition *in utero* ont été évalués dans les études suivantes.

Une étude préliminaire a été réalisée par Saillenfait *et al.* (2005) dans laquelle des rates Sprague-Dawley gestantes ont été exposées par gavage (véhicule : huile d'olive) à 0, 250, 500, 750, 1000 mg/kg/j de DIBP du 6<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour de la gestation avec un examen du contenu utérin et un examen macroscopique du tractus reproducteur des fœtus vivants. Chez la mère, le gain de poids corporel était diminué aux deux plus fortes doses pendant les derniers jours de traitement, sans impact sur le poids corporel corrigé avec le poids utérin. Une augmentation du pourcentage de résorptions était observée à partir de 500 mg/kg/j. A partir de la dose de 750 mg/kg/j, une diminution du poids des fœtus et une augmentation du nombre de testicules non descendus étaient rapportées. A partir de cette étude préliminaire, un NOAEL de 250 mg/kg/j a pu être

proposé par les auteurs. Cette étude étant une étude préliminaire, elle a donc été réalisée avec peu d'animaux (10 à 14 femelles gestantes) et comprenait un examen limité des fœtus. De plus, le niveau de détails rapporté dans la publication est relativement faible.

Suite à cette étude préliminaire, Saillenfait *et al.* (2006) ont exposé des rates Sprague-Dawley gestantes par gavage (véhicule : huile d'olive) à 0, 250, 500, 750, 1000 mg/kg/j de DIBP du 6<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour de la gestation avec un examen du contenu utérin et des effets développementaux au 21<sup>ème</sup> jour de gestation. Une diminution du gain de poids corporel maternel a été observée dès le début du traitement à partir de 500 mg/kg/j, effet non observé lorsque le poids corporel a été ajusté au poids de l'utérus gravide. Une réduction du nombre de fœtus vivants, associée à une augmentation marquée des résorptions, a été notée dès la dose de 750 mg/kg/j. Le poids fœtal était diminué à partir de 500 mg/kg/j. Des malformations viscérales et squelettiques ainsi qu'un retard dans la migration transabdominale des testicules ont été rapportés aux deux plus fortes doses. Sur la base de cette expérience, un NOAEL de 250 mg/kg/j a été identifié par les auteurs.

Dans une autre étude réalisée par Saillenfait *et al.* (2008), des rates Sprague-Dawley gestantes ont été exposées par gavage (véhicule : huile d'olive) à 0, 125, 250, 500, 625 mg/kg/j de DIBP du 12<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour de la gestation avec des examens des descendants jusqu'à l'âge adulte. Aucune toxicité maternelle n'a été rapportée. Dès la plus faible dose testée, une dégénérescence des tubules séminifères et une diminution du poids absolu de la prostate à l'âge adulte ont été observées. La distance anogénitale (DAG) était diminuée significativement dès la dose 250 mg/kg/j à JPN (jour post natal) 1. Dès JPN 12-14, une rétention des mamelons était apparente chez les mâles à cette même dose. Une augmentation du nombre de malformations (cryptorchidie, hypospadias) était mise en évidence ainsi qu'une diminution, à l'âge adulte, du poids des testicules, épидидymes, vésicules séminales et de la prostate dès la dose de 500 mg/kg/j. Un retard pubertaire statistiquement significatif a aussi été observé dès cette même dose. Le poids des mâles était diminué significativement à JPN 1 et JPN 21 uniquement pour la dose de 625 mg/kg/j. Sur la base de cette expérience, aucun NOAEL n'a pu être dérivé car des effets ont été notés à toutes les doses testées. Un LOAEL de 125 mg/kg/j a été identifié.

D'après le rapport du Consumer Product Safety Commission (CPSC, 2011), une étude non publiée soumise par BASF (2003) à la Commission Européenne (2004) n'a pas montré d'effet du DIBP sur le nombre de résorptions ou de fœtus viables ni sur le nombre de malformations à des doses allant jusqu'à 942 mg/kg/j administrées dans la nourriture à des rates Wistar gestantes du 6<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour de la gestation. Les effets observés ont consisté en une faible diminution du poids corporel fœtal et une augmentation de l'incidence de variations squelettiques à la plus forte dose testée. L'administration *via* l'alimentation pourrait expliquer en partie ces résultats en contradiction avec ceux obtenus dans les trois études de Saillenfait *et al.* (2005, 2006 & 2008) sur le DIBP.

Les effets spécifiques du DIBP sur la production de la testostérone fœtale ou sur la stéroïdogénèse ont été évalués par Furr *et al.* (2014), Howdeshell *et al.* (2008) et Hannas *et al.* (2011 & 2012).

L'équipe de Howdeshell *et al.* (2008) a montré une diminution de la sécrétion *ex vivo* de testostérone par le testicule fœtal après exposition par gavage de rattes gestantes au DIBP du 8<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> jour de la gestation dès la dose de 300 mg/kg/j (- 40%). A la plus forte dose testée de 900 mg/kg/j, une augmentation des résorptions a été rapportée. Sur la base de cette expérience, un NOAEL de 100 mg/kg/j a été proposé par les auteurs.

Cet effet a également été observé par l'équipe de Hannas *et al.* (2011). En effet, une diminution statistiquement significative de la production de testostérone fœtale a pu être observée dès 300 mg/kg/j (-56%) après exposition par gavage de rates gestantes au DIBP du 14<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> jour de la gestation. Une diminution statistiquement significative de l'expression de deux gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, StAR (Steroidogenic acute regulatory protein) dès 300 mg/kg/j et CYP11A1 dès 100 mg/kg/j a aussi été rapportée. Aucun NOAEL n'a pu être dérivé du fait de la diminution de CYP11A1 à toutes les doses testées. Sur la base de la diminution de la testostérone, le NOAEL est de 100 mg/kg/j. Suite à ces résultats, Hannas *et al.* (2012) ont réalisé une nouvelle étude analysant les effets du DIBP administré par gavage à des doses allant de 100 à 900 mg/kg/j chez des rates Sprague-Dawley gestantes du 14<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> jour de la gestation sur la production de testostérone et sur les gènes pouvant être impliqués dans des voies de signalisation pour la détermination, la différenciation et le développement sexuels mâle. Une diminution de la production de testostérone testiculaire *ex vivo* a été observée à la dose de 500 mg/kg/j. L'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse (tels que CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, Scarb1 (Scavenger receptor class B member 1), StAR, CYP11A1, Insl3 (Insuline like 3) et Hsd3b (hydroxy-delta-5 steroid dehydrogenase)) était réduite dès 300 mg/kg/j et ce, de façon dose-dépendante.

Enfin, une diminution de la testostérone a aussi été rapportée avec 750 mg/kg/j de DIBP par Furr *et al.* (2014) qui ont administré à des rates Sprague-Dawley gestantes différents phtalates par gavage du 14<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> jour de gestation.

D'autres études évaluant la toxicité du DIBP sur le développement ont été réalisées à des doses supérieures aux NOAEL détaillés ci-dessus.

Dans l'étude de Borch *et al.* (2006), des rates Wistar gestantes ont été exposées par gavage à 0 ou 600 mg/kg/j de DIBP du 7<sup>ème</sup> au 19<sup>ème</sup> ou 20/21<sup>ème</sup> jour de la gestation. La distance anogénitale a été réduite chez les mâles au 20/21<sup>ème</sup> jour de la gestation avec une réduction de la production et du contenu en testostérone testiculaire. Des hyperplasies des cellules de Leydig, des vacuolisations des cellules de Sertoli, la présence de gonocytes multinucléés et des gonocytes en position centrale ont également été rapportés chez ces mâles. De plus, l'expression des protéines P450scc et StAR dans les cellules de Leydig était réduite. Ces effets ont été retrouvés chez les mâles au 19<sup>ème</sup> jour de la gestation mais à une sévérité réduite.

Dans l'étude de Boberg *et al.* (2008), le DIBP a été administré par gavage chez des rates Wistar gestantes à la dose de 0 ou 600 mg/kg/j du 7<sup>ème</sup> au 19<sup>ème</sup> ou 21<sup>ème</sup> jour de la gestation. Une réduction des taux

plasmatiques en leptine et en insuline a été rapportée chez les petits sacrifiés au 21<sup>ème</sup> jour de la gestation. Chez les mâles, une réduction de la distance génitale associée à une diminution de la production de testostérone, de l'expression de l'Insl-3 (insulin like 3) et des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse (StAR, CYP17, Scarb1, P450scc aux 19<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours de gestation) a été observée. Les taux d'ARN messenger pour PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor) ont été réduits au 19<sup>ème</sup> jour de gestation dans les testicules et le foie (effet non retrouvé au 21<sup>ème</sup> jour de gestation). Chez les femelles, le DIBP a induit une augmentation de la distance anogénitale ainsi qu'une augmentation des taux d'ARN messenger pour l'aromatase dans les ovaires.

Des effets du DIBP sur les testicules chez des rats Sprague-Dawley et souris C57Bl/6N prépubertaires (âgés de 21 jours) ont été évalués par Zhu *et al.* (2010). Trois types d'expérimentation ont été réalisées. Le DIBP a été administré par gavage à des doses allant de 100 à 1000 mg/kg/j en dose unique ou pendant 7 jours consécutifs par gavage. La réversibilité des effets jusqu'à 8 jours a été évaluée chez le rat recevant du DIBP à 1000 mg/kg/j en dose unique par gavage. Une apoptose des cellules spermatiques après administration unique ou répétée a été rapportée chez le rat dès 500 mg/kg/j. Une diminution du poids des testicules a également été observée dans cette espèce après administration répétée dès 500 mg/kg/j. Ces effets étaient réversibles dès 6 jours après l'arrêt du traitement. A l'exception d'une diminution du poids testiculaire à 1000 mg/kg/j, les souris, quant à elles, ne présentaient pas d'effet testiculaire lié à l'administration de DIBP. L'étude a aussi montré une désorganisation ou une disparition des filaments de vimentine dans les régions périnucléaires et basales des cellules de Sertoli chez les rats exposés pendant 7 jours à 500 mg/kg/j de DIBP.

Enfin, des études ont évalués les effets du DIBP sur les testicules de rats et de souris adultes. Dans la première étude, des rats mâles JCL Wistar âgés de 5 semaines ont été exposés à 2% de DIBP dans la nourriture pendant une semaine. Les animaux ont présentés une diminution du poids corporel et des poids absolu et relatif des testicules ainsi qu'une augmentation du poids du foie. L'analyse histopathologique a montré une réduction des spermatocytes et des spermatogonies. Une augmentation de la testostérone et une diminution de la concentration en zinc (impliqué dans le développement testiculaire) ont été mesurées dans les testicules (Oishi et Hiraga, 1980a). Le même protocole d'étude a été utilisé avec des souris JCL :ICR. Une diminution du gain de poids corporel, une augmentation du poids relatif des testicules et du foie ainsi qu'une réduction du poids relatif des reins ont été notées. La concentration en zinc était réduite dans les testicules mais les teneurs en testostérone étaient normales (Oishi et Hiraga, 1980b).

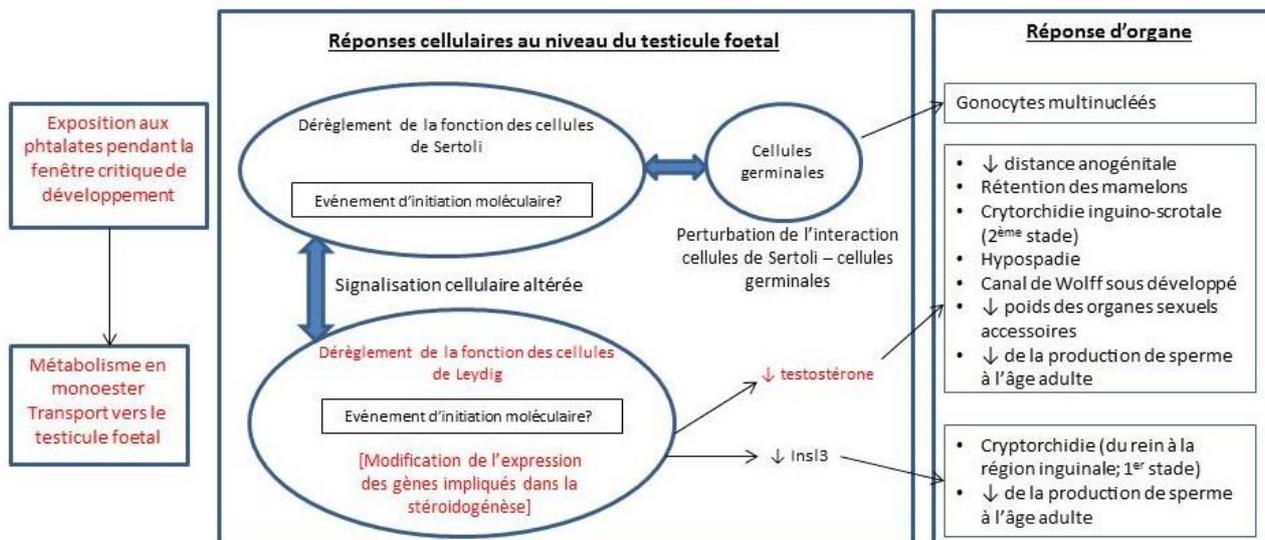
Parmi toutes ces données, les études clés évaluant la reprotoxicité du DIBP sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Liste des études clés évaluant la reprotoxicité du DIBP

Protocole	Effets	LOAEL / NOAEL (mg/kg/j)	Référence
Rates Sprague-Dawley gestantes 0, 250, 500, 750, 1000 mg/kg/j du 6 <sup>ème</sup> au 20 <sup>ème</sup> jour de la gestation par gavage	Effets maternels : ↓ gain de poids corporel maternel, sans impact sur le poids corrigé dès 500 mg/kg/j  Effets développementaux : Dès 500 mg/kg/j : ↓ du poids foetal Dès 750 mg/kg/j : ↓ du nombre de foetus vivants, ↑ des résorptions, malformations viscérales et squelettiques, retard dans la migration transabdominale des testicules.	500 / 250	Saillenfait <i>et al.</i> (2006)
Rates Sprague-Dawley gestantes 0, 125, 250, 500, 625 mg/kg/j du 12 <sup>ème</sup> au 21 <sup>ème</sup> jour de la gestation par gavage	Effets maternels : Aucun  Effets développementaux : A toutes les doses testées : dégénérescence des tubules séminifères et ↓ du poids absolu de la prostate à l'âge adulte Dès 250 mg/kg/j : ↓ DAG, rétention des mamelons chez les mâles Dès 500 mg/kg/j : ↑ du nombre de malformations (cryptorchidie, hypospadias), ↓ du poids des testicules, des épидидymes, des vésicules séminales et de la prostate à l'âge adulte, retard pubertaire. A 625 mg/kg/j : ↓ du poids des mâles à jpn1 et jpn21	125 / -	Saillenfait <i>et al.</i> (2008)

### 3.3 Mécanismes d'action

Le mécanisme d'action proposé pour les effets reprotoxiques induits par le DIBP implique une perturbation du système endocrinien, survenant pendant une période spécifique du développement. Ainsi, les effets reprotoxiques sont liés à des dérèglements au niveau des cellules de Sertoli avec effets directs sur les cellules germinales ou à des dérèglements au niveau des cellules de Leydig avec diminution de la production de testostérone et d'Insl3.



**Figure 3 : Représentation des cibles cellulaires des phtalates incluant les modifications génétiques et hormonales ainsi que les réponses au niveau des organes (Santé Canada, 2015)**

La plupart des effets listés dans la figure 3 sont retrouvés avec le DIBP. En effet, dans les études réalisées par Saillenfait *et al.* (2005, 2006 & 2008), le DIBP induit une altération du système reproducteur (avec malformations et effets histologiques au niveau des testicules), un retard pubertaire et une rétention des mamelons chez les descendants mâles. Le principal mécanisme d'action pouvant expliquer ces effets consiste en une diminution de la production de testostérone. Cet effet est confirmé dans les études réalisées par Furr *et al.* (2014), Howdeshell *et al.* (2008) et Hannas *et al.* (2011 & 2012) montrant une diminution de la production *ex vivo* de testostérone fœtale après administration de DIBP *in utero*.

Le retard de descente transabdominale des testicules rapporté avec le DIBP dans les études de Saillenfait *et al.* (2006 & 2013), est quant à lui dépendant de la production par les cellules de Leydig fœtales d'Insl3.

### 3.4 Extrapolation de l'animal à l'Homme

Le DIBP possède un effet anti-androgénique chez le rat, caractérisé par une altération de la production de la testostérone par le testicule fœtal et des effets histologiques et cliniques chez les descendants mâles. Cependant, un nombre croissant de données récentes suggèrent que l'activité androgénique du testicule fœtal n'est pas affectée par les phtalates chez l'Homme. Les études épidémiologiques, étudiant une corrélation entre l'exposition de la femme enceinte ou du nouveau-nés aux phtalates et une réduction de l'activité androgénique du testicule fœtal ou néonatal, ne sont pas de qualité suffisante pour conclure à une association entre l'exposition et l'effet. De plus, des études *in vitro* et des modèles de xenogreffe n'ont pas mis en évidence d'effet antiandrogénique de certains phtalates chez l'Homme alors que cet effet était retrouvé chez le rat. Enfin, les phtalates sont probablement sans effet sur l'activité stéroïdogénique du testicule fœtal chez la souris pendant le début du développement testiculaire ainsi que chez le moustiquier (Anses, 2015c). **Cependant, même si l'Homme semble être moins sensible que le rat aux effets anti-**

**androgéniques des phtalates, des études supplémentaires sont nécessaires pour conclure à une absence totale de sensibilité.**

La toxicité des phtalates sur le système reproducteur mâle n'est pas uniquement dépendante d'une diminution de la production de la testostérone. Un effet direct sur les cellules germinales et une diminution de la production d'Insl3 sont également rapportés (figure 3). **A ce jour, ces mécanismes d'action sont considérés extrapolables à l'Homme.**

## 4 Recueil des valeurs toxicologiques de référence

Plusieurs VTR reprotoxiques ont été trouvées dans la littérature pour le DIBP.

Deux VTR ont été construites par le CPSC (2011). La première VTR couvre les effets sur la reproduction sur la base d'une augmentation des résorptions observées dans l'étude de Saillenfait *et al.* (2005) dans laquelle des rates gestantes ont été exposées du 6<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour de la gestation. La deuxième VTR couvre les effets sur le développement sur la base d'une diminution de la production de testostérone testiculaire observée dans l'étude de Howdeshell *et al.* (2008) dans laquelle des rates gestantes ont été exposées du 8<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> jour de la gestation. Dans les deux cas, une approche par Benchmark dose a été appliquée à l'aide du logiciel BMDs version 2.1.2 de l'EPA en considérant un excès de risque à 10% et une limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95%. Ainsi pour les effets sur la reproduction, une VTR de 0,85 mg/kg/j a été obtenue en appliquant à la  $BMD_{10\%L_{95\%}}$  de 85 mg/kg/j, un facteur d'incertitude total de 100 (10 pour la variabilité inter-espèce et 10 pour la variabilité intra-espèce). Pour les effets sur le développement, une VTR de 0,098 mg/kg/j a été obtenue en appliquant à la  $BMD_{10\%L_{95\%}}$  de 9,8 mg/kg/j, un facteur d'incertitude total de 100 (10 pour la variabilité inter-espèce et 10 pour la variabilité intra-espèce).

En juin 2012, le RAC (Risk Assessment Committee) a dérivé une VTR reprotoxique pour le DIBP suite à la soumission par le Danemark d'un dossier de restriction sur 4 phtalates dont le DIBP. L'effet critique retenu consistait en une dégénérescence testiculaire avec oligospermie ou azoospermie rapportée au LOAEL de 125 mg/kg/j dans l'étude de Saillenfait *et al.* (2008) après exposition de rates gestantes du 12<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour de la gestation. Ce LOAEL a été jugé conservateur considérant la faible incidence des effets à cette dose, cependant, le RAC a noté la forte pente de la relation dose-réponse. Après application d'un facteur d'incertitude de 10 pour la variabilité intra-espèce, de 10 pour la variabilité inter-espèce (4 x 2,5) et de 3 pour prendre en compte l'extrapolation LOAEL – NOAEL, la forte pente de la relation dose-réponse et la faible base de données disponible pour cette substance, une VTR de 0,4 mg/kg/j a été dérivée.

Le RAC (2012) n'ayant pas accepté la restriction proposée dans le dossier soumis par le Danemark, l'ECHA a soumis un nouveau dossier de restriction en 2016 (ECHA, 2016). Dans ce dossier, une VTR pour le DIBP a été proposée avec une lecture croisée avec le DnBP (dibutyl-n-phtalate) considérant les similitudes structurales, physicochimiques et toxicologiques entre ces deux substances et pour pallier aux incertitudes liées à l'absence de doses inférieures à 100 mg/kg/j dans l'étude de Saillenfait *et al.* (2008) réalisée avec le DIBP. L'effet critique retenu avec le DnBP consistait en une diminution spermatocytaire dans la descendance mâle et des hypoplasies mamelonnaires dans la descendance femelle observés à la dose de 2 mg/kg/j administrée dans l'alimentation à des rates Sprague-Dawley à partir du 15<sup>ème</sup> jour de gestation jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour après la mise bas (Lee *et al.*, 2004). Cependant, en comparant différents paramètres, le DIBP a été jugé moins toxique que le DnBP. Par conséquent, un ajustement de 25% a été appliqué au LOAEL du DnBP pour obtenir une dose critique de 2,5 mg/kg/j pour le DIBP. Après application d'un facteur

d'incertitude de 10 pour la variabilité intra-espèce, de 10 pour la variabilité inter-espèce (4 x 2,5) et de 3 pour prendre en compte l'extrapolation LOAEL – NOAEL, une VTR de 0,0083 mg/kg/j a été dérivée pour le DIBP.

**Tableau 4 : VTR reprotoxique existantes pour le DIBP**

Organisme (année)	Effet critique Etude source	Dose critique	UF	VTR	Durée d'application
CPSC (2011)	Effets sur la reproduction (augmentation des résorptions)  Saillenfait <i>et al.</i> , 2005	BMD <sub>10%</sub> L <sub>95%</sub> = 85 mg/kg/j	100 UF <sub>A</sub> = 10 UF <sub>H</sub> = 10	0,85 mg/kg/j	court terme
	Effets développementaux (diminution de la production de testostérone testiculaire foétale)  Howdeshell <i>et al.</i> , 2008	BMDL <sub>10</sub> = 9,8 mg/kg/j	100 UF <sub>A</sub> = 10 UF <sub>H</sub> = 10	0,098 mg/kg/j	court terme
ECHA / RAC (2012)	Dégénérescence testiculaire avec oligospermie ou azoospermie  Saillenfait <i>et al.</i> , 2008	LOAEL = 125 mg/kg/j	300 UF <sub>A</sub> = 10 UF <sub>H</sub> = 10 UF <sub>L</sub> = 3	0,4 mg/kg/j	court terme
ECHA (2016)	Lecture croisée avec le DnBP  Diminution spermatocytaire dans la descendance mâle et hypoplasies mamelonnaires dans la descendance femelle  Lee <i>et al.</i> , 2004	LOAEL <sub>DnBP</sub> = 2 mg/kg/j  <u>Ajustement au DIBP :</u> LOAEL <sub>DnBP</sub> ajusté à 25% considérant une sévérité plus faible pour le DIBP LOAEL <sub>DIBP</sub> = 2,5 mg/kg/j	300 UF <sub>A</sub> = 10 UF <sub>H</sub> = 10 UF <sub>L</sub> = 3	0,0083 mg/kg/j	moyen terme

## 5 Proposition de VTR pour les effets reprotoxiques

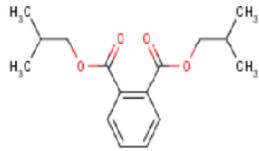
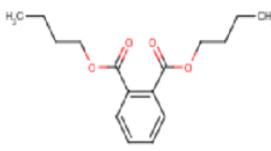
### 5.1 Choix de l'effet critique

Deux options ont été analysées pour dériver une VTR pour les effets reprotoxiques pour le DIBP :

- Choisir l'effet critique à partir des données spécifiques au DIBP
- Faire une lecture croisée avec le DnBP.

Les données montrent que le DIBP induit des effets sur le développement, incluant principalement une mortalité fœtale et des effets sur le système reproducteur mâle. Les études les plus pertinentes pour la dérivation d'une VTR reprotoxique sont celles réalisées par *Saillendait et al.* (2006 & 2008). Parmi ces études, la plus faible dose critique est le LOAEL de 125 mg/kg/j, dose à laquelle sont rapportées des dégénérescences testiculaires (*Saillenfait et al.* 2008). Cependant, le jeu d'études disponibles sur le DIBP est relativement limité en termes de doses testées, de durée d'exposition et d'effets analysés. Ainsi, la substance n'a pas été testée à des doses inférieures à 100 mg/kg/j et certains effets critiques pouvant apparaître à des doses plus faibles n'ont pas été évalués. Par conséquent, la dérivation d'une VTR sur la base des données spécifiques au DIBP serait associée à beaucoup d'incertitudes. Les effets rapportés étant cohérents avec ceux retrouvés avec d'autres phtalates de chaîne moyenne et le DIBP présentant des similitudes structurales avec le DnBP, une lecture croisée entre le DIBP et le DnBP a été considérée. La comparaison des données physicochimiques et de toxicité sur le développement est résumée dans les tableaux ci-dessous. Concernant les données sur le développement, les principaux effets critiques associés avec leurs LOAEL /NOAEL les plus faibles ont été reportés.

**Tableau 5 : Comparaison des données physicochimiques du DnBP et du DIBP en vue d'une lecture croisée pour la dérivation d'une VTR reprotoxique**

	<b>DIBP</b>	<b>DnBP</b>
Structure chimique		
Nombre de carbone sur la chaîne alkyle	3 C (4 au total)	4C
Etat physique	Liquide	Liquide <i>EU RAR (2004) cité dans ECHA (2016)</i>
Poids moléculaire (g.mol <sup>-1</sup> )	278,35	278,35 <i>EU RAR (2004) cité dans ECHA (2016)</i>
Point de fusion (°C)	-64 à -37	-69 <i>EU RAR (2004) cité dans ECHA (2016)</i>
Point d'ébullition (°C)	296,5 - 327	340 <i>EU RAR (2004) cité dans ECHA (2016)</i>
Densité (g/cm <sup>3</sup> )	1,05 à 15°C ; 1,04 à 20°C	1,045 à 20°C <i>EU RAR (2004) cité dans ECHA (2016)</i>
Pression de vapeur (Pa)	0,01 à 20°C	0,0097 à 25°C <i>EU RAR (2004) cité dans ECHA (2016)</i>
Solubilité dans l'eau (mg/L)	1 – 20 à 20°C 6,2 à 24°C	10 à 20°C <i>EU RAR (2004) cité dans ECHA (2016)</i>
Coefficient de partage	4,11	4,57 <i>EU RAR (2004) cité dans ECHA (2016)</i>

**Tableau 6 : Comparaison des données de toxicité sur le développement du DnBP et du DIBP en vue d'une lecture croisée pour la dérivation d'une VTR reprotoxique**

	DIBP	DnBP
Effets sur le tractus reproducteur mâle (LOAEL / NOAEL en mg/kg/j)	Dégénérescence des tubules séminifères (125 / -)  <i>Etude de Saillenfait et al. (2008) : Rats exposés par gavage de JPC12-21</i>	↓ du nombre de spermatoocytes chez la descendance adulte (2 / -)  <i>Etude de Lee et al. (2004) : Rats exposés dans la nourriture de JPC15 à JPN21 (citée dans le dossier CLH du DiHP (2016) et ECHA (2016))</i>
Effets sur la glande mammaire (LOAEL / NOAEL en mg/kg/j)	Rétention des mamelons chez les mâles (250 / 125)  <i>Etude de Saillenfait et al. (2008) : Rats exposés par gavage de JPC12-21</i>	Rétention des mamelons chez les mâles (100 / 50)  <i>Etude de Mylchreest et al. (1999) : Rats exposés par gavage de JPC12-21 (citée dans CLH DiHP (2016) et ECHA (2016))</i>
	Aucune étude n'a investigué les effets du DIBP sur le développement de la glande mammaire chez les femelles.	Hypoplasies mamelonaires chez les femelles (2 / -)  <i>Etude de Lee (2004) : Rats exposés dans la nourriture de JPC15 à JPN21 (citée dans le dossier CLH du DiHP (2016) et ECHA (2016))</i>
Mortalité fœtale (LOAEL / NOAEL en mg/kg/j)	Résorption et ↓ du nombre de petits vivants (750 / 500)  <i>Etude de Saillenfait et al. (2006) : Rats exposés par gavage de JPC6-20</i>	↓ du nombre de petits vivants (52-80 / -)  <i>Etude du NTP (1995) : Rats exposés dans la nourriture dans un protocole d'élevage en continu (citée dans le dossier CLH du DiHP (2016) et ECHA (2016))</i>
Diminution de la DAG (LOAEL / NOAEL en mg/kg/j)	250 / 125  <i>Etude de Saillenfait et al. (2008) : Rats exposés par gavage de JPC12-21</i>	250 / 100  <i>Etude de Mylchreest et al. (1999) : Rats exposés par gavage de JPC12-21 (citée dans le dossier CLH du DiHP (2016) et ECHA (2016))</i>

Les effets du DIBP et du DnBP sur la production de la testostérone et sur l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des stéroïdes ont également été évalués. Les résultats reportés ci-dessous sont issus du dossier de restriction soumis par l'ECHA pour 4 phtalates incluant le DIBP et le DnBP (ECHA, 2016).

**Tableau 7 : Comparaison des effets du DIBP et du DnBP sur la production de la testostérone et sur l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des stéroïdes**

	<b>DIBP (LOAEL / NOAEL ou ED<sub>50</sub> en mg/kg/j)</b>	<b>DnBP (LOAEL / NOAEL ou ED<sub>50</sub> en mg/kg/j)*</b>
SR-B1	300 / 100 <i>Hannas et al. (2012)</i>	50 / 10 <i>Lehmann et al. (2004)</i>
StAR	300 / 100 <i>Hannas et al. (2012)</i>	50 / 10 <i>Lehmann et al. (2004)</i>
CYP11A	300 / 100 <i>Hannas et al. (2012)</i>	50 / 10 <i>Lehmann et al. (2004)</i>
3bHSD	300 / 100 <i>Hannas et al. (2012)</i>	50 / 10 <i>Lehmann et al. (2004)</i>
CYP17A1	300 / 100 <i>Hannas et al. (2012)</i>	500 / 100 <i>Lehmann et al. (2004)</i>
Diminution de la production de la testostérone ( <i>ex vivo</i> ) (LOAEL / NOAEL en mg/kg/j ou ED <sub>50</sub> ** en mg/kg/j)	300 / 100 <i>Hannas et al. (2011 &amp; 2012) et Howdeshell (2008)</i>	300 / 100 <i>Howdeshell et al. (2008)</i>
	ED <sub>50</sub> : 288 (rats Harlan SD) <i>Furr et al. (2014)</i>	ED <sub>50</sub> : 158 (rats Harlan SD) ED <sub>50</sub> : 337 (rats CR SD) <i>Furr et al. (2014)</i>

\* A noter que Santé Canada a publié un rapport sur la catégorisation des phtalates en 2015 et que des LOAEL plus bas ont été rapportés pour SR-B1 (LOAEL = 1 mg/kg/j) et 3bHSD (LOAEL = 0,1 mg/kg/j) après exposition au DnBP (Health Canada, 2015).

\*\* ED50 : dose résultant en une diminution de 50% de la production de testostérone

Sur la base de ces résultats, il est observé une toxicité similaire sur le développement entre le DIBP et le DnBP, même si le DIBP semble produire ces effets à des doses plus élevées que le DnBP. Cependant, les protocoles différents (en termes de durée de traitement, de doses et d'effets analysés) utilisés avec ces deux substances ne permettent pas une comparaison simple de leur sévérité respective. Une seule étude, réalisée par Saillenfait *et al.* (2008), compare le DIBP et le DnBP dans un même protocole. Alors que le DIBP a été testé aux doses de 125, 250, 500 et 625 mg/kg/j chez des rates gestantes du 12<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour de la gestation, le DnBP a été administré dans les mêmes conditions à la dose unique de 500 mg/kg/j. La sévérité du DIBP par rapport au DnBP dépend de l'effet pris en compte. Par exemple, alors que ces deux substances induisent une diminution de la distance anogénitale comparable à une même dose de 500 mg/kg/j, une incidence plus importante de rétention des mamelons et de malformations du système reproducteur tels que des hypospadias et des testicules non descendus a été rapportée après exposition au DnBP.

En conclusion, le jeu d'études actuellement disponible avec le DIBP est relativement limité. La comparaison des profils du DIBP et du DnBP indique que le DIBP présente une toxicité sur le développement similaire à celle du DnBP. Même s'il semble y avoir des différences de sévérité entre ces deux substances, celles-ci

restent mineures considérant les résultats de l'étude de Saillenfait *et al.* (2008). Les effets les plus sensibles reportés avec le DnBP sont une diminution spermatocytaire dans la descendance mâle et des hypoplasies mamelonnaires dans la descendance femelle après une exposition du 15<sup>ème</sup> jour de la gestation au 21<sup>ème</sup> jour post-natal (Lee *et al.*, 2004). Cet effet a été rapporté à toutes les doses testées, la plus faible étant équivalente à 2 mg/kg/j. Aucune étude avec un protocole similaire n'est disponible avec le DIBP. **Au vu des similarités structurales, physicochimiques et toxicologiques entre le DnBP et le DIBP, les experts considèrent que le DIBP pourrait induire des effets comparables aux DnBP dans les mêmes conditions. Par conséquent, il a été décidé d'utiliser l'effet critique (diminution spermatocytaire dans la descendance mâle et des hypoplasies mamelonnaires) observé avec le DnBP pour la VTR du DIBP. Cette approche a été validée par le CES pour le DIBP dans le cadre de cette saisine mais la pertinence de cette approche devra également être analysée pour l'élaboration de VTR reprotoxique d'autres phtalates.**

## 5.2 Analyse des VTR existantes

Trois VTR reprotoxiques sont disponibles avec le DIBP: deux dérivées par le CPSC (2011), une dérivée par le RAC (2012) et une dérivée par l'ECHA (2016).

La VTR de 0,85 mg/kg/j construite par le CPSC (2011) a été dérivée à partir d'une étude préliminaire réalisée par Saillenfait *et al.* (2005). Cette étude a donc été réalisée avec peu d'animaux et comprenait un examen limité des fœtus. De plus, le niveau de détails rapporté dans l'étude est relativement faible. Enfin, les experts du CES ont considéré que l'utilisation des données spécifiques au DIBP pour l'élaboration d'une VTR reprotoxique était associée à trop d'incertitudes. Ainsi, ils ont préféré appliquer une lecture croisée avec le DnBP considérant les similarités entre ces deux substances.

La VTR de 0,098 mg/kg/j construite par le CPSC (2011) a été dérivée sur la base d'une diminution de la testostérone. Cependant, à ce jour, il n'est pas possible de définir un seuil de diminution pouvant être considéré comme néfaste, du fait de la large variabilité biologique de ce paramètre chez l'Homme. Enfin, les experts du CES ont considéré que l'utilisation des données spécifiques au DIBP pour l'élaboration d'une VTR reprotoxique était associée à trop d'incertitudes. Ainsi, ils ont préféré appliquer une lecture croisée avec le DnBP considérant les similarités entre ces deux substances.

La VTR de 0,4 mg/kg/j construite par le RAC (2012) a été dérivée à partir d'un LOAEL sur la base d'effets histologiques observés dans l'étude de Saillenfait *et al.* (2008). Considérant l'absence de NOAEL dans cette étude et étant donné les similarités entre le DIBP et le DnBP, cette VTR est associée à de trop grandes incertitudes. Ainsi, les experts du CES ont préféré appliquer une lecture croisée avec le DnBP considérant les similarités entre ces deux substances.

La VTR de 0,0083 mg/kg/j construite par l'ECHA (2016) a été dérivée à partir d'une lecture croisée avec le DnBP avec un ajustement à 25% considérant le DIBP moins reprotoxique que le DnBP. Cet ajustement n'a pas été jugé approprié par les experts du CES. En effet, les différences de sévérité entre ces deux substances ont été considérées mineures et dépendantes soit du protocole utilisé soit de l'effet critique évalué.

En conclusion, aucune des VTR disponibles pour le DIBP dans la littérature n'a été considérée adéquate. Les experts du CES proposent donc la construction d'une nouvelle VTR sur la base d'une lecture croisée avec le DnBP.

Les VTR disponibles pour le DnBP dans la littérature sont listées dans le tableau 8. **Etant la plus protectrice, la VTR du DnBP construite par l'Afsset (2009) est retenue comme VTR pour le DIBP.**

L'étude clé retenue est celle de Lee *et al.* (2004). Dans cette étude, des rates Sprague-Dawley (8 animaux par dose) ont été exposées *via* la nourriture du quinzième jour de gestation jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour après la parturition, soit la fin de la lactation. L'alimentation était supplémentée en DnBP à des concentrations égales à 0 – 20 – 200 – 2000 et 10000 ppm, correspondant à des doses de 0 – 2 – 24 – 234 et 1137 mg/kg/j. Une réduction des spermatoocytes testiculaires est constatée au 21<sup>ème</sup> jour après la naissance dès la concentration de 20 ppm (2 mg/kg/j) chez 50 % des mâles, de même que des changements au niveau des glandes mammaires chez les nouveau-nés de sexe féminin (hypoplasie des bourgeons alvéolaires). Les effets retenus sont une diminution spermatoocytaire chez le mâle ( $p < 0,05$ ) et des hypoplasies mamelonnaires chez les femelles ( $p < 0,05$ ). Cette étude avait été retenue considérant sa qualité, l'observation d'effets signant une perturbation endocrinienne en l'absence d'une toxicité maternelle, l'utilisation d'une période de sensibilité critique, le suivi post-traitement comprenant une comparaison de l'évolution des signes de toxicité et l'identification du LOAEL le plus faible.

Les facteurs d'incertitude suivants avaient été retenus :

- Variabilité inter-espèces ( $UF_A$ ) : 10
- Variabilité interindividuelle ( $UF_H$ ) : 10
- Utilisation d'une BMDL, d'un LOAEL/C ou d'un NOAEL/C ( $UF_{B/L}$ ) : 10

L'application de ce facteur avait été justifiée par la grande variabilité au sein de l'étude comme en témoignait la différence observée entre les valeurs de BMD et de BMDL calculées dans le rapport de l'Afsset (2009) et l'absence de NOAEL. En outre, la première dose testée entraînait déjà un effet chez 50% des animaux pour la diminution spermatoocytaire et chez 100% des animaux pour la dysplasie mamelonnaire.

En conclusion, la VTR du DnBP élaborée par l'Afsset (2009) est de 0,002 mg/kg/j. Elle est considérée applicable au DIBP.

Tableau 8: VTR reprotoxiques existantes pour le DnBP

Organisme (année)	Effet critique Etude source	Dose critique	UF	VTR
EFSA (2005)	Diminution spermatocytaire dans la descendance mâle et hypoplasies mamelonnaires dans la descendance femelle  Lee <i>et al.</i> , 2004	LOAEL = 2 mg/kg/j	200 UF <sub>A</sub> = 10 UF <sub>H</sub> = 10 UF <sub>L</sub> = 2	0,01 mg/kg/j
Afsset (2009)			1000 UF <sub>A</sub> = 10 UF <sub>H</sub> = 10 UF <sub>L</sub> = 10	0,002 mg/kg/j
ECHA (2016)			300 UF <sub>A</sub> = 10 UF <sub>H</sub> = 10 UF <sub>L</sub> = 3	0,0067 mg/kg/j
ATSDR (2001)	Effets développementaux  Mylchreest <i>et al.</i> , 2000	NOAEL = 50 mg/kg/j	100	0,5 mg/kg/j
CPSC (2010)	Diminution de la fertilité mâle après exposition <i>in utero</i>  Mahood <i>et al.</i> , 2007	NOAEL = 20 mg/kg/j	100	0,2 mg/kg/j

### 5.3 Niveau de confiance

Le niveau de confiance global a été attribué à la VTR reprotoxique du DIBP en se basant sur les critères suivants :

- Niveau de confiance dans la nature et la qualité des données : **moyen**

Le jeu d'études actuellement disponible avec le DIBP est relativement limité en terme de doses testées, de durée d'exposition et d'effets analysés. Ainsi, une lecture croisée avec le DnBP a été considérée adéquate pour dériver une VTR reprotoxique pour le DIBP. De nombreuses études réalisées avec des protocoles

différents sont disponibles avec le DnBP. Ces études vont d'études de toxicité répétée, à des études sur plusieurs générations en passant par des études étudiant la toxicité pré et péri-natale. Cependant, la VTR pour le DIBP étant basée sur une lecture croisée avec le DnBP, un niveau de confiance moyen pour la nature et la qualité des données a été considéré adéquat.

- Niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et le mode d'action : **fort**

Au vu des connaissances sur les phtalates, les effets critiques retenus sont jugés pertinents et semblent être particulièrement sensibles. Les effets sont cohérents avec les mécanismes d'action de reprotoxicité imputables aux phtalates. Enfin, ces effets sont jugés transposables à l'Homme.

- Niveau de confiance dans choix de l'étude clé : **moyen**

Un niveau de confiance moyen est attribué à l'étude de Lee *et al.* (2004) considérant l'absence de NOAEL et une durée d'exposition restreinte du 15<sup>ème</sup> jour de gestation à JPN 21.

- Niveau de confiance dans le choix de la dose critique : **moyen**

Un niveau de confiance moyen est attribué au choix de la dose critique considérant l'utilisation d'un LOAEL.

Le niveau de confiance global pour cette VTR est donc **moyen**.

## 6 Conclusions du CES

Une VTR reprotoxique est proposée pour le DIBP sur la base d'une lecture croisée avec le DnBP (Tableau 9). Un niveau de confiance moyen a été attribué à cette VTR.

Le CES rappelle que, concernant les effets sur le développement, il est généralement admis qu'une exposition unique peut suffire pour induire la survenue de l'effet si l'exposition survient lors d'une phase critique du développement embryo-fœtal. Ce type de VTR est applicable pour des durées d'exposition courtes (quelques heures à quelques jours). Par conséquent, la dose d'exposition est directement celle à retenir sans ajustement concernant la durée de l'exposition.

**Tableau 9 : VTR reprotoxique pour le DIBP**

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR
Diminution spermatocytaire et les lésions dysplasiques mamelonaires observées avec le DnBP (Lee <i>et al.</i> , 2004)	LOAEL = 2 mg/kg/j	1000	<b>VTR = 0,002 mg/kg/j</b>
		UF <sub>A</sub> : 10 UF <sub>H</sub> : 10 UF <sub>B/L</sub> : 10	<b>Niveau de confiance : moyen</b>

En raison de la présence massive et dispersée des phtalates, une construction de VTR, si besoin par lecture croisée, devrait être élargie à d'autres phtalates.

**Date de validation du rapport d'expertise collective par le comité d'experts spécialisé : le 30/03/2017.**

**Signature :**

Maisons-Alfort, le \_\_\_\_\_,

Au nom des experts du CES

« Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence »,

**M Guerbet**

## 7 Bibliographie

Date de fin de la bibliographie : 18/01/2017

- Afsset. Valeurs toxicologiques de référence (VTR). Elaboration de VTR fondées sur les effets reprotoxiques. Saisine Afsset n°2003/AS03. Avril 2010.
- Anses. Etude de l'alimentation totale (EAT 2). 21 juin 2011.
- Anses. Connaissances relatives à la réglementation, à l'identification, aux propriétés chimiques, à la production et aux usages eds composés de la famille des phtalates (Tome 1). Mars 2015a.
- Anses. Connaissances relatives aux données de contamination et aux expositions par des composés de la famille des phtalates (Tome 2). Mars 2015b.
- Anses. Connaissances relatives aux données de toxicité sur les composés de la famille des phtalates (Tome 3). Mars 2015c.
- ATSDR (Agency for Toxic substances and disease Registry). Toxicological profile for Di-n-butyl phthalate. September 2001.
- Metzdorff S, Wortziger R, Axelstad M, Brokken L, Vinggaard AM, Dalgaard M, Nellemann C. Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology*. 2008 Sep 4;250(2-3):75-81. doi: 10.1016/j.tox.2008.05.020.
- Borch J, Axelstad M, Vinggaard AM, Dalgaard M. Diisobutyl phthalate has comparable anti-androgenic effects to di-n-butyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicol Lett*. 2006 Jun 1;163(3):183-90.
- CLH report for Diisohexyl phthalate (DiHP) – 71880-09-4. July 5, 2016.
- CPSC. Final toxicity review of diisobutyl phthalate (DIBP). 14 July 2011.
- CPSC. Toxicity review for Di-n-butyl phthalate (Dibutyl phthalate or DBP). 7 April 2010.
- ECHA. Annex XV restriction report. Proposal for a restriction. Substance names: four phthalates (DEHP, BBp, DBP, DIBP). 1 April 2016.
- EFSA. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to di-butylphthalate (DBP) for use in food contact materials. 2005.
- Furr JR, Lambright CS, Wilson VS, Foster PM, Gray LE Jr. A short-term in vivo screen using fetal testosterone production, a key event in the phthalate adverse outcome pathway, to predict disruption of sexual differentiation. *Toxicol Sci*. 2014 Aug 1;140(2):403-24.
- Hannas BR, Lambright CS, Furr J, Howdeshell KL, Wilson VS, Gray LE Jr. Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisohexyl phthalate, and diisononyl phthalate. *Toxicol Sci*. 2011 Sep;123(1):206-16.
- Hannas BR, Lambright CS, Furr J, Evans N, Foster PM, Gray EL, Wilson VS. Genomic biomarkers of phthalate-induced male reproductive developmental toxicity: a targeted RT-PCR array approach for defining relative potency. *Toxicol Sci*. 2012 Feb;125(2):544-57.

- Health Canada. Stakeholder Technical Workshop Document. Approach for using chemical categories and read-across to address data gaps for effects on the developing male reproductive system. Phthalate substance grouping. August 2015.
- Howdeshell KL, Wilson VS, Furr J, Lambright CR, Rider CV, Blystone CR, Hotchkiss AK, Gray LE Jr. A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicol Sci.* 2008 Sep;105(1):153-65.
- INSERM. Reproduction et environnement. 2011
- Koch HM, Christensen KL, Harth V, Lorber M, Brüning T. Di-n-butyl phthalate (DnBP) and diisobutyl phthalate (DiBP) metabolism in a human volunteer after single oral doses. *Arch Toxicol.* 2012 Dec;86(12):1829-39.
- Lee K-Y, Shibutani M, Takagi H, Kato N, Takigami S, Uneyama C, Hirose M. Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology.* 2004 ; 203 : 221–238
- Oishi S, Hiraga K. Testicular atrophy induced by phthalic acid esters: effect on testosterone and zinc concentrations. *Toxicology and Applied pharmacology.* 1980; 53: 35-41.
- Oishi S, Hiraga K. Effect of phthalic acid esters on mouse testes. *Toxicology letters.* 1980; 5:413-16.
- RAC. Opinion on an Annex XV dossier proposing restrictions on four phthalates. ECHA/RAC/RES-O-0000001412-86-07/F. 15 June 2012.
- Saillenfait AM, Sabaté JP, Gallissot F. Developmental toxic effects of diisobutyl phthalate administered by gavage to rats. *Toxicology.* 2005; 213(3): 231-232.
- Saillenfait AM, Sabaté JP, Gallissot F. Developmental toxic effects of diisobutyl phthalate, the methyl-branched analogue of di-n-butyl phthalate, administered by gavage to rats. *Toxicol Lett.* 2006 Aug 1;165(1):39-46.
- Saillenfait AM, Sabaté JP, Gallissot F. Diisobutyl phthalate impairs the androgen-dependent reproductive development of the male rat. *Reprod Toxicol.* 2008 Oct;26(2):107-15.
- Zhu XB, Tay TW, Andriana BB, Alam MS, Choi EK, Tsunekawa N, Kanai Y, Kurohmaru M. Effects of di-isobutyl phthalate on testes of prepubertal rats and mice. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2010 Feb;86(4):129-36.

**Notes**

---







Agence nationale de sécurité sanitaire  
de l'alimentation, de l'environnement et du travail  
14 rue Pierre et Marie Curie  
94701 Maisons-Alfort Cedex  
[www.anses.fr](http://www.anses.fr) / [@Anses\\_fr](https://twitter.com/Anses_fr)