

Choix et variabilité de certains biomarqueurs d'exposition aux phtalates

Période : novembre 2010 à février 2011

Radhouane CHAKROUN

Institut de Santé et de Sécurité au Travail (Tunisie) – Laboratoires de Biologie et de Toxicologie Professionnelle, Unité de Recherche « Santé et Environnement du Travail » – Tunis (Tunisie)

Mots clés : Biomarqueurs, Métabolites, Phtalates, Variabilité

Les phtalates appartiennent à une famille de composés chimiques dérivés de l'acide phtalique. Cette famille est composée de nombreux congénères pouvant être de faible poids moléculaire (DMP⁽¹⁾, DEP⁽²⁾...) ou plus lourds tels que le DEHP⁽³⁾ ou le DINP⁽⁴⁾. Les phtalates sont essentiellement utilisés en tant que plastifiants dans les industries de fabrication du PVC. Ils sont également utilisés dans les industries pharmaceutiques ainsi que dans les produits cosmétiques et de soins corporels. On les trouve par conséquent, dans les produits manipulés, voire ingérés de manière quotidienne.

Les expérimentations animales suggèrent que certains composés de la famille des phtalates sont des perturbateurs endocriniens ayant une activité anti-androgène, toxiques pour l'appareil reproducteur et son développement. Certains phtalates, tels que le DEHP ou le DINP sont soupçonnés d'avoir des effets sur la reproduction chez les humains, notamment sur la fertilité et le développement pré et post-natal.

Les phtalates sont métabolisés par hydrolyse produisant les mono-esters correspondants. Cette hydrolyse est suivie de réactions d'oxydation conduisant à des métabolites secondaires composés de dérivés oxydés qui seront par la suite conjugués et éliminés par la voie urinaire.

Le choix pertinent d'un biomarqueur, du moment du (des) prélèvement(s) et la connaissance des divers facteurs pouvant influencer la toxicocinétique ou le métabolisme (âge, sexe, habitudes personnelles...) sont des éléments cruciaux pour une évaluation correcte de l'exposition.

Trois études récentes fournissent des informations utiles sur les métabolites urinaires d'un certain nombre de phtalates en tant que biomarqueurs d'exposition.

Étude observationnelle de la variation des concentrations urinaires des métabolites du phtalate de diéthyle et du phtalate de bis(2-éthylhexyle) durant une semaine chez huit adultes

Preau JL Jr, Wong LY, Silva MJ, Needham LL, Calafat AM. Variability over 1 week in the urinary concentrations of metabolites of diethyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate among eight adults: an observational study. *Environ Health Perspect.* 2010; 118: 1748-1754.

Analyse

L'exposition individuelle aux phtalates est très variable dans le temps. Elle est liée au régime alimentaire, aux types de produits cosmétiques et de soins corporels utilisés, ainsi qu'aux diverses activités quotidiennes, en particulier professionnelles. L'équipe de Preau *et al.* (2010) étudie les variations journalières et hebdomadaires des concentrations urinaires du MEP⁽⁵⁾, métabolite du DEP et du MEHHP⁽⁶⁾, métabolite du DEHP. Toutes les mictions durant 7 jours consécutifs (427 échantillons urinaires au total) ont été recueillies chez 8 sujets adultes (4 de chaque sexe), âgés de 25 à 59 ans, non exposés professionnellement aux phtalates.

Les CV⁽⁷⁾ intra-individuels des concentrations (exprimés en µg/g créatinine) de MEP et de MEHHP dans les échantillons urinaires

recueillis durant la semaine ont varié respectivement de 62 à 157 % (CV moyen = 92 %) et de 74 à 263 % (CV moyen = 161 %).

Une grande variation intra-individuelle journalière a également été observée pour les deux métabolites étudiés. Le profil d'excrétion urinaire du MEP était clairement cyclique chez 3 participants. Une excrétion cyclique, mais moins prononcée de MEHHP a également été observée chez 2 autres participants.

Quel que soit le type d'échantillonnage: ponctuel, urines du matin ou urines de 24 heures, 64 à 77 % de la variance totale observée pour le MEP étaient dus à la variance interindividuelle. Les auteurs l'expliquent par le fait que l'exposition au DEP est essentiellement due à la diversité des produits pouvant être utilisés pour les soins corporels; ceux-ci étant la principale source d'exposition au DEP. L'utilisation de ces produits de manière régulière et au même moment dans la journée pourrait expliquer le profil cyclique de l'excrétion urinaire de MEP observée chez certains sujets.

En revanche, pour le MEHHP, c'est la variance intra-individuelle qui contribue à hauteur de 80 % à la variance totale. D'après les auteurs, elle pourrait être imputée à la variation du type d'aliments ingérés d'un jour à l'autre, l'alimentation étant la principale source d'exposition au DEHP chez la plupart des individus.

Pour les échantillons ponctuels, la variabilité des concentrations

des deux métabolites au cours de la journée est supérieure à celle observée entre les journées ou entre les individus. La moyenne géométrique des concentrations de MEP dans les échantillons urinaires prélevés le matin ou l'après-midi étaient significativement plus élevées que celles dans les échantillons prélevés le soir ($p < 0,01$). C'est une observation cohérente avec les horaires habituels d'utilisation des produits cosmétiques et d'hygiène. La moyenne géométrique des concentrations urinaires de MEHHP était au contraire, significativement plus élevée dans les échantillons prélevés le soir que dans ceux du matin ou de l'après-midi ($p < 0,01$).

Commentaire

Cette étude a mis en évidence une forte variation des concentrations urinaires des métabolites (MEP et MEHHP) d'un jour à l'autre et/ou d'un individu à l'autre, ainsi que durant la journée. Pour les deux métabolites étudiés, cette variation dans la journée évolue dans un sens opposé, avec une baisse des concentrations de MEP le soir, période à laquelle, les concentrations de MEHHP sont les plus élevées. Pour une évaluation correcte de l'exposition aux phtalates de diverses origines, il semble donc nécessaire d'effectuer plusieurs prélèvements urinaires à différents moments de la journée et à différents jours de la semaine. Pour évaluer l'exposition aux phtalates dont la principale source est alimentaire, un prélèvement urinaire le soir paraît le mieux indiqué. Dans cette étude de Preau *et al.* (2010) le nombre de participants était relativement faible et constitué exclusivement de personnes adultes. Ainsi, avant de décliner une stratégie de prélèvement, il semble nécessaire d'étudier la reproductibilité de ces résultats avec un plus grand nombre d'individus et la répétabilité des dosages de ces biomarqueurs, étudier et en particulier, confirmer ses tendances chez les enfants dont les habitudes alimentaires et/ou l'utilisation de produits de soins corporels peuvent être très différentes.

Sélection des biomarqueurs adéquats de l'exposition aux phtalates de diisononyl et de diisodécyle à partir des données de l'enquête nationale sur la nutrition et la santé 2005-2006 aux États-Unis

Calafat AM, Wong LY, Silva MJ, Samandar E, Preau JL Jr, Jia LT, Needham LL. Selecting adequate exposure biomarkers of diisononyl and diisododecyl phthalates: data from the 2005-2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *Environ Health Perspect.* 2011; 119: 50-55.

Analyse

Les phtalates de diisononyl (DINP) et de diisodécyle (DIDP⁽⁸⁾) sont essentiellement utilisés comme produits plastifiant dans les industries du PVC. Suite à l'exposition, ces phtalates sont rapidement métabolisés produisant les mono-esters correspondants qui peuvent secondairement être oxydés. Les études antérieures de biosurveillance de l'exposition aux

divers dérivés des phtalates réalisées chez l'Homme ont montré qu'une grande partie de la population générale des pays développés était exposée à plusieurs phtalates tels que le DEP, le DBP⁽⁹⁾, le BBzP⁽¹⁰⁾, ou le DEHP. Cependant, pour les phtalates de haut poids moléculaire tel que le DINP, les études basées sur le dosage des mono-esters comme le MNP⁽¹¹⁾ n'ont pas révélé une exposition importante. Ceci pourrait être en partie à la faible sensibilité de l'indicateur biologique (MNP), du fait de sa rapide métabolisation en dérivés oxydés qui sont par la suite excrétés dans les urines. Les études utilisant les dérivés oxydés, biomarqueurs plus sensibles selon les données toxicocinétiques sont plutôt assez peu nombreuses et se limitent à la population adulte.

Cette étude américaine de Calafat *et al.* (2011) avait pour objectifs de déterminer les concentrations urinaires des dérivés oxydés issus du métabolisme du DINP (MCOP⁽¹²⁾) et du DIDP (MCNP⁽¹³⁾) dans un échantillon représentatif de la population américaine âgée de 6 ans et plus et de comparer les deux indicateurs d'exposition au DINP (MNP et MCOP). Deux mille cinq cent quarante-huit échantillons urinaires ont ainsi été analysés par extraction sur phase solide en ligne couplée à la chromatographie liquide à haute performance et à la spectrométrie de masse en tandem. La quantification est basée sur la méthode de la dilution isotopique.

Le MNP n'a été détecté que dans 12,9 % des échantillons et à des concentrations généralement faibles (0,8 µg/L - 148,1 µg/L). Le MCOP a été détecté dans 95,2 % des échantillons avec des concentrations variant entre 0,7 µg/L et 4961 µg/L. Dans 82,4 % de ces échantillons le MNP n'a pas été détecté. Ces résultats confirment le manque de sensibilité de l'indicateur. Les études antérieures ayant utilisé le MNP comme indicateur biologique d'exposition auraient par conséquent sous-estimé les niveaux d'exposition au DINP ce qui montre l'importance d'utiliser des biomarqueurs appropriés. Chez les 334 sujets pour qui le MNP et le MCOP ont été détectés, une bonne corrélation ($R = 0,63$) a été trouvée entre les concentrations ajustées sur celle de la créatinine urinaire des deux métabolites.

Le MCNP a été détecté dans 89,9 % des échantillons. Les concentrations de ce métabolite du DIDP étaient comprises entre 0,6 et 672,6 µg/L.

Les concentrations moyennes de MCOP et de MNCP étaient significativement plus élevées chez les enfants de 6 à 11 ans par rapport à celles observées chez les adolescents et les adultes ($p < 0,01$). Elles étaient également supérieures chez les sujets à haut revenus ($p = 0,01$ pour le MCOP et $p = 0,004$ pour le MNCP) comparés à ceux ayant un bas revenu.

Commentaire

L'étude de Calafat *et al.* (2011) présente l'avantage d'inclure un nombre important de sujets, y compris des enfants. Bien que la méthode analytique utilisée soit sensible, le MNP, métabolite mineur du DINP n'a été détecté que dans un faible nombre d'échantillons. Ce métabolite n'est vraisemblablement pas un bon indicateur biologique d'exposition au DINP.

La détection du MCOP et du MCNP dans un grand nombre

d'échantillons suggère qu'il y a une large exposition au DINP et au DIDP aux États-Unis et que l'exposition des enfants est supérieure à celle des adolescents et des jeunes adultes. Cependant, cette étude de Calfat *et al.* (2011) a été réalisée sur des échantillons urinaires prélevés en 2005 et 2006. Or la législation a évolué aussi bien aux États-Unis qu'en Europe avec la restriction de l'utilisation de ces phtalates qui ne peuvent plus être utilisés comme substances ou composants de préparation à des concentrations supérieures à 0,1 % en masse de matière plastifiée, dans les jouets et les articles de puériculture (Directive 2005/84/EC). Il serait intéressant d'évaluer les niveaux d'exposition actuels à ces phtalates, notamment chez les enfants.

Les métabolites urinaires et sériques du phtalate de di-n-pentyle chez les rats.

Silva MJ, Furr J, Samandar E, Preau JL Jr, Gray LE, Needham LL, Calafat AM. Urinary and serum metabolites of di-n-pentyl phthalate in rats. *Chemosphere*. 2011; 82: 431-436.

Analyse

Le DPP⁽¹⁴⁾ est essentiellement utilisé comme agent plastifiant pour la nitrocellulose. Les données de toxicologie animale font état d'une toxicité testiculaire chez la progéniture de rattes exposées à de fortes doses de DPP pendant la gestation.

Se basant sur la similitude du métabolisme du DPP chez les rats et chez l'Homme, cette étude de Silva *et al.* (2011) a cherché à identifier parmi les métabolites urinaires et sériques, les biomarqueurs potentiels pour l'évaluation de l'exposition humaine au composé. Une dose unique de 500 mg/kg de poids corporel a été administrée par voie orale à 9 rattes adultes. Les urines ont été collectées 24 et 48 h après l'administration du produit. Le sérum a été collecté à la nécropsie, soit 48 heures après l'administration. Les métabolites ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem après extraction sur phase solide en ligne. Deux métabolites ont été identifiés par utilisation de matériaux de référence : PA⁽¹⁵⁾ et MCCP⁽¹⁶⁾. Pour le reste des métabolites, l'identification s'est basée sur les profils des spectres de masse. Six métabolites supplémentaires ont ainsi été identifiés : MPP⁽¹⁷⁾, MOPP⁽¹⁸⁾, MHPP⁽¹⁹⁾, MCBP⁽²⁰⁾, MCEP⁽²¹⁾ et MPeP⁽²²⁾.

Les médianes des concentrations des métabolites dans les urines étaient 993 µg/mL pour le MHPP, 168 µg/mL pour le MCBP, 0,2 µg/mL pour le MCEP, 222 µg/mL pour le MPP, 47 µg/mL pour le MOPP, 16 µg/mL pour le MPeP, 26 µg/mL pour le PA et 9 µg/mL pour le MCPP.

Le MCPP n'a pas été détecté dans le sérum. Les autres métabolites ont été détectés à des concentrations beaucoup plus faibles que dans les urines. Le MPP, étant le métabolite le moins hydrophile, avait la concentration médiane la plus élevée dans le sérum, soit : 135×10^{-3} µg/mL.

Les auteurs proposent le MHPP urinaire comme biomarqueur d'exposition au DDP, étant donné qu'il est le métabolite majeur et qu'il ne peut provenir que du métabolisme du DDP. Afin de vérifier qu'il peut servir à l'évaluation de l'exposition humaine, 45 échantillons urinaires prélevés chez des sujets adultes résidant

aux États-Unis non exposés professionnellement au DDP ont été analysés. Le MHPP a été détecté dans 29 % des échantillons. La concentration maximale était égale de 8 ng/mL.

Le MCBP et le MCPP ont été détectés dans la majorité des échantillons analysés avec des concentrations atteignant respectivement 221 et 40 ng/mL. Cependant, ces métabolites ne sont pas spécifiques au DDP et peuvent provenir de l'exposition à d'autres phtalates. Ceci est confirmé par l'absence de corrélation entre chacun de ces métabolites avec le MHPP, alors qu'il y avait une excellente corrélation entre les concentrations ces mêmes métabolites dans les urines des rats.

Commentaire

L'étude de Silva *et al.* (2011) a exploré les différents métabolites urinaires et sériques du DDP chez le rat dans le but de sélectionner un biomarqueur utilisable pour l'évaluation de l'exposition humaine. Le MHPP semble être le plus indiqué de part sa spécificité et son abondance par rapport aux autres métabolites. Cependant, cette étude a été faite sur des rats et avec une unique dose forte. D'autre part, les proportions de métabolites excrétés peuvent être différentes chez l'Homme. Il serait utile d'étudier les concentrations du métabolite chez un nombre plus important de sujets appartenant aux différentes tranches d'âges, d'autant plus que l'étude animale a mis en évidence une grande variabilité interindividuelle.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les études décrites fournissent des renseignements utiles sur la biosurveillance de l'exposition aux phtalates, notamment sur le choix de l'indicateur biologique d'exposition et du moment de prélèvement urinaire. L'étude de Preau *et al.* (2010) met en évidence une forte variabilité intra-individuelle de l'excrétion urinaire du MEP et du MEHHP, biomarqueurs respectifs du DEP et du DEHP, en particulier au cours de la journée. Cette variabilité est plus importante d'une journée à l'autre. Elle fait ressortir la nécessité de multiplier les prélèvements ponctuels dans une journée, en particulier quand des métabolites de phtalates d'origines différentes sont étudiés. Dans le cas de biosurveillance de l'exposition aux phtalates dont la principale source est alimentaire, les concentrations de métabolites mesurées dans les échantillons d'urines du soir, fournissent une meilleure indication sur les niveaux d'exposition. L'étude de Calafat *et al.* (2011) a concerné les phtalates de haut poids moléculaire : DINP et DIDP. Elle confirme l'intérêt de privilégier l'utilisation des métabolites oxydés comme biomarqueurs, notamment le MCOP, par rapport aux mono-esters correspondants. Un choix de biomarqueur est également fourni par l'étude de Silva *et al.* (2011) qui met en évidence l'intérêt d'utiliser le MHPP en tant qu'indicateur biologique d'exposition par rapport aux autres métabolites du DDP.

Lexique

- (1) DMP: dimethyl Phthalate ou phtalate de diméthyle
- (2) DEP: diethyl phthalate ou phtalate de diéthyle.
- (3) DEHP: di(2-ethylhexyl)phthalate ou phtalate de bis(2-éthylhexyle).
- (4) DINP: di-isononyl phthalate ou phtalate de diisononyle
- (5) MEP: monoethyl phthalate, ou Monoéthylphtalate, métabolite du Phtalate de diéthyle (DEP).
- (6) MEHHP: mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate, métabolite du Phtalate de bis(2-éthylhexyle), connu sous le nom de DEHP.
- (7) CV: coefficient de variation.
- (8) DIDP: di-isodecyl phthalate ou phtalate de diisodécyle.
- (9) DBP: di-n-butylphtalate ou phtalate de dibutyle.
- (10) BBzP: benzylbutylphtalate ou phtalate de benzyle et de butyle.
- (11) MNP: monoisononyl phthalate ou phtalate de mono-isononyle.
- (12) MCOP: monocarboxyisooctyl phthalate.
- (13) MCNP: monocarboxyisononyl phthalate.
- (14) DPP: di-n-pentyl phthalate ou phtalate de di-n-pentyle.
- (15) PA: phthalic acid ou Acide phtalique.
- (16) MCCP: mono(3-carboxypropyl) phthalate.
- (17) MPP: mono-n-pentyl phthalate.
- (18) MOPP: mono(4-oxopentyl) phthalate.
- (19) MHPP: mono(4-hydroxypentyl) phthalate.
- (20) MCBP: mono(4-carboxybutyl) phthalate.
- (21) MCEP: mono(2-carboxyethyl) phthalate.
- (22) MPeP: mono-n-pentenyl phthalate.

Revue de la littérature

Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annu Rev Physiol.* 2011; 73: 135-162.

Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reprod Toxicol.* 2010; Article sous presse.

Autres publications identifiées

Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM et al. Variability and Predictors of Urinary Bisphenol A Concentrations during Pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2011; 119: 131-137.

L'objectif de cette étude était d'étudier la variation de la concentration urinaire de Bisphénol A (BPA) durant la grossesse. Elle met en évidence plusieurs sources d'exposition au BPA. La grande variabilité des concentrations durant la grossesse incite à multiplier les prélèvements durant cette période et prendre en compte les habitudes tabagiques des sujets.

Christensen KY, Maisonet M, Rubin C et al. Exposure to polyfluoroalkyl chemicals during pregnancy is not associated with offspring age at menarche in a contemporary British cohort.

Environ Int. 2011; 37: 129-135.

Il s'agit d'une étude cas-témoin sur l'effet de l'exposition aux composés polyfluoroalkylés pendant la grossesse sur la puberté de la descendance. Le PFOS et le PFOA étaient les composés prédominants dans le sérum des femmes enceintes étudiées. L'exposition aux composés polyfluoroalkylés est ubiquitaire mais ne semble ne pas avoir un impact sur l'âge de la puberté.

Meeker JD, Yang T, Ye X et al. Urinary Concentrations of Parabens and Serum Hormone Levels, Semen Quality Parameters, and Sperm DNA Damage. *Environ Health Perspect.* 2011; 119: 252-257. *Il s'agit d'une étude de la relation entre les concentrations urinaires de parabens et certains indicateurs de la fertilité masculine: hormones sériques, qualité du sperme et atteintes de l'ADN des spermatozoïdes. Aucune preuve ou association n'a été trouvée. Ceci peut être dû au faible nombre de cas étudiés.*

Ye X, Zhou X, Needham LL et al. In vitro oxidation of bisphenol A: Is bisphenol A catechol a suitable biomarker for human exposure to bisphenol A? *Anal Bioanal Chem.* 2011; 399: 1071-1079.

Cette étude a cherché à évaluer un métabolite intermédiaire comme biomarqueur d'exposition au bisphénol A: 5-hydroxy-bisphénol A (BPA catechol). Le composé a été trouvé instable et en faible concentration dans les urines. Les auteurs concluent qu'il ne conviendrait pas comme biomarqueur d'exposition au bisphénol A.

Ye X, Zhou X, Bishop AM et al. Does the composition of urine change when collected from disposable diapers and other absorbent materials? *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2010; 20: 644-649.

C'est une étude du recouvrement du bisphénol A, du triclosan et la 4-methylumbellifénone sous la forme libre ou conjugué à partir des urines récupérées sur les couches, tampon en coton et compresses. Contrairement aux espèces libres, les composés glucuro-conjugués ont été presque totalement récupérés.

Gollenberg AL, Hediger ML, Lee PA et al. Association between Lead and Cadmium and Reproductive Hormones in Peripubertal U.S. Girls. *Environ Health Perspect.* 2010; 118: 1782-1787.

Il s'agit d'une étude de la relation entre les plombémies et les concentrations de cadmium urinaire et les hormones inhibine B et lutéinisante chez 705 jeunes filles âgées entre 6 et 11 ans examinées dans le cadre du programme NHANES (1988-1994). Les plombémies ont été trouvées inversement proportionnelles aux taux d'inhibine B, marqueur du développement folliculaire. Les effets suggérant un retard à la puberté étaient plus prononcés pour les jeunes filles ayant des concentrations élevées de cadmium urinaire.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Biomarker, Disruptor, Endocrine, Exposure, Human.