

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Valeurs limites d'exposition en milieu professionnel

Le di-n-butyl-phtalate

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Mai 2017

Édition scientifique



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Valeurs limites d'exposition en milieu professionnel

Le di-n-butyl-phtalate

Avis de l'Anses

Rapport d'expertise collective

Mai 2017

Édition scientifique

Le Directeur général

Maisons-Alfort, le 5 mai 2017

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

relatif à la proposition de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel

Evaluation des effets sur la santé et des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail pour

Le trichloroéthylène (TCE) (N° CAS : 79-01-6)
Le di-n-butyl-phtalate (DnBP) (N° CAS : 84-74-2)
Le butylbenzyl-phtalate (BBzP) (N° CAS : 85-68-7)
Le 2-éthoxyéthanol (EGEE) (N°CAS 110-80-5)
L'acétate de 2-éthoxyéthyle (EGEEA) (N°CAS 111-15-9)
Le butan-1-ol (N° CAS : 71-36-3)

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 a été saisie le 12 juin 2007 par la direction générale du travail (DGT) afin de mener les travaux d'expertise nécessaires à la fixation de valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP) pour une vingtaine de substances dont le trichloroéthylène (TCE) (saisine n° 2007-SA-0432), le di-n-butyl-phtalate (DnBP) (saisine n° 2012-SA-0223), le butylbenzyl-phtalate (BBzP) (saisine n° 2012-SA-0224). L'agence s'est autosaisie sur le 2-éthoxyéthanol et son acétate (EGEE et EGEEA) (saisine n° 2010-SA-316).

L'Anses a également été saisie le 3 février 2012 par la DGT afin de mener les travaux d'expertise nécessaires à la fixation de valeurs limites d'exposition professionnelle pour le butan-1-ol (saisine n° 2012-SA-0083).

1. CONTEXTE ET OBJET DES SAISINES

- Le trichloroéthylène (TCE)

La France dispose d'une valeur moyenne d'exposition au TCE sur 8 heures indicative de 405 mg.m⁻³ (75 ppm) et d'une valeur limite d'exposition court terme indicative de 1080 mg.m⁻³ (200 ppm) (circulaire¹ de 1983).

Le comité scientifique européen chargé de mener l'expertise en matière de limites d'exposition professionnelle à des agents chimiques (SCOEL²) a recommandé en avril 2009 une VLEP sur 8 heures de 10 ppm (54,7 mg.m⁻³), une valeur sur 15 minutes de 30 ppm (164,1 mg.m⁻³) et l'attribution de la mention « peau ».

- Le di-n-butyl-phtalate (DnBP) et le butylbenzyl-phtalate (BBzP)

La France dispose actuellement d'une valeur moyenne d'exposition pour le DnBP sur 8 heures indicative de 5 mg.m⁻³ (circulaire de 1987³). En revanche, la France ne dispose actuellement pas de valeurs limites d'exposition professionnelle VLEP (sur 8 heures ou 15 minutes) pour le BBzP.

Un rapport d'expertise du SCOEL, soumis à consultation de novembre 2013 à avril 2014, recommandait pour le DnBP une VLEP-8h de 0,05 ppm (0,58 mg.m⁻³) et n'attribuait pas de mention « peau ».

- Le 2-éthoxyéthanol (EGEE) et l'acétate de 2-éthoxyéthyle (EGEEA)

Lors de la consultation organisée par la Commission européenne en 2007 sur les rapports du SCOEL concernant l'EGEE et l'EGEEA, des experts du groupe de travail de l'agence en charge de la saisine «évaluation des expositions françaises aux éthers de glycol » avaient fait part de leur désaccord quant aux valeurs recommandées par le SCOEL. Pour cette raison et conformément à sa mission d'expertise sur les VLEP, l'Anses a décidé de procéder à une réévaluation des effets toxiques du 2-éthoxyéthanol et de son acétate afin que le ministère du travail puisse actualiser si nécessaire les valeurs limites indicatives européennes fixées par la directive 2009/161/UE. Dans l'attente des résultats des travaux d'expertise, les valeurs fixées dans la directive européenne ont été transposées dans le droit national notamment *via* le décret n°2012-746 du 9 mai 2012. Ainsi la France dispose actuellement d'une VLEP-8h contraignante pour l'EGEE de 8 mg.m⁻³ (2 ppm) et d'une VLEP-8h contraignante pour l'EGEEA de 11 mg.m⁻³ (2 ppm). Ces composés font tous deux l'objet d'une mention « peau ».

- Le butan-1-ol

La France dispose actuellement d'une valeur limite d'exposition court terme indicative pour le butan-1-ol de 150 mg.m⁻³ (soit 50 ppm) (circulaire⁴ de 1982).

¹ Circulaire du 1er décembre 1983 complétant l'annexe de la circulaire du 19 juillet 1982 relative aux valeurs admises pour les concentrations de certaines substances dangereuses dans l'atmosphère des lieux de travail

² Scientific Committee on Occupational Exposure Limits

³ Circulaire du 13 mai 1987 complétant l'annexe de la circulaire du 19 juillet 1982 relative aux valeurs admises pour les concentrations de certaines substances dangereuses dans l'atmosphère des lieux de travail

⁴ Circulaire du 19 juillet 1982 relative aux valeurs admises pour les concentrations de certaines substances dangereuses dans l'atmosphère des lieux de travail

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

Les expertises ont été réalisées dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

Les expertises collectives relèvent du domaine de compétences du comité d'experts spécialisés (CES) « Expertise en vue de la fixation de valeurs limites à des agents chimiques en milieu professionnel » (CES-VLEP) ». L'Anses a confié les travaux d'expertise aux groupes de travail « effets sanitaires » (mandat 2010-2013), « métrologie » (mandat 2010-2013), à des rapporteurs et à des agents de l'Anses. Les travaux ont été présentés au CES-VLEP tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques.

Le présent avis se fonde pour les aspects scientifiques :

- Concernant le **trichloroéthylène** sur le rapport intitulé : « Expertise collective en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel relatif à l'évaluation des effets sur la santé et des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail pour le trichloroéthylène (avril 2013) ». Le CES-VLEP (mandat 2010-2013) a adopté la synthèse et les conclusions de l'expertise collective le 12 janvier 2012. Le rapport et la note d'expertise collective ont fait l'objet d'une consultation publique du 18/10/2012 au 20/12/2012. Les personnes ou organismes ayant contribué à la consultation publique sont listés en annexe du rapport d'expertise collective. Les commentaires reçus ont été examinés et discutés par le CES-VLEP (mandat 2010-2013) qui a adopté la version finalisée le 4 avril 2013.
- Concernant le **di-n-butyl-phtalate** sur le rapport intitulé : « Expertise collective en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel relatif à l'évaluation des effets sur la santé et des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail pour le di-n-butyl-phtalate (décembre 2015) ». Le rapport ainsi que la synthèse et les conclusions de l'expertise collective ont été adoptées par le CES-VLEP (mandat 2010 - 2013) le 10 octobre 2013. Ce rapport et les conclusions ont fait l'objet d'une consultation publique du 27/08/2014 au 28/10/2014. Aucun commentaire n'a été reçu lors de la consultation. Le rapport ainsi que la note d'expertise collective ont été adoptés par le CES-VLEP (mandat 2014-2017) lors de la séance du 14 décembre 2015.
- Concernant le **butylbenzyl-phtalate** sur le rapport intitulé : « Expertise collective en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel relatif à l'évaluation des effets sur la santé et des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail pour le butylbenzyl-phtalate (mars 2016) ». Le rapport ainsi que la synthèse et les conclusions de l'expertise collective ont été adoptés par le CES-VLEP (mandat 2014 - 2017) le 13 mai 2014. Ce rapport et les conclusions ont fait l'objet d'une consultation publique du 12/03/2015 au 12/05/2015. Les personnes ou organismes ayant contribué à la consultation publique sont listés en annexe du rapport d'expertise collective. Les commentaires reçus ont été examinés et discutés par le CES-VLEP qui a adopté la version finalisée le 7 mars 2016.
- Concernant le **2-éthoxyéthanol et l'acétate de 2-éthoxyéthyle** sur le rapport intitulé : « Expertise en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel relatif à l'évaluation des effets sur la santé et des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail pour le 2-éthoxyéthanol et l'acétate de 2-éthoxyéthyle (avril 2013) ». Le rapport ainsi que la synthèse et les conclusions de l'expertise collective ont été adoptés par le CES-VLEP (mandat 2010 - 2013) le 9 septembre 2011. Le rapport a fait l'objet d'une consultation publique du 18/10/2012 au 20/12/2012. Aucun commentaire n'a été reçu lors de la consultation. Le CES-VLEP (mandat 2010-2013) a finalement adopté la version finalisée le 4 avril 2013.

- Concernant le **butan-1-ol** sur le rapport intitulé : « Expertise collective en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel relatif à l'évaluation des effets sur la santé et des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail pour le butan-1-ol (octobre 2015) ». Le rapport ainsi que la synthèse et les conclusions de l'expertise collective ont été adoptés par le CES-VLEP (mandat 2014-2017) le 4 juillet 2014. Ce rapport et les conclusions ont fait l'objet d'une consultation publique du 11/05/2015 au 13/07/2015. Les personnes ou organismes ayant contribué à la consultation publique sont listés en annexe du rapport d'expertise collective. Le commentaire reçu a été examiné et discuté par le CES-VLEP qui a adopté la version finalisée le 12 octobre 2015.

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 publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

Pour chaque substance objet du présent avis, les tableaux n°1 et 2 reprennent de façon synthétique les recommandations du CES VLEP en matière de VLEP, élaborées conformément à son guide méthodologique⁵, à savoir :

- les VLEP recommandées sur une durée de 8 heures (VLEP-8h) ; il s'agit de la limite de la moyenne, pondérée en fonction du temps, de la concentration atmosphérique d'un agent chimique dans la zone de respiration d'un travailleur au cours d'un poste de travail 8 heures. Dans l'état actuel des connaissances scientifiques (en toxicologie, médecine, épidémiologie, etc.), la VLEP-8h est censée protéger d'effets sur la santé, à moyen et long termes, les travailleurs exposés à l'agent chimique considéré régulièrement et ce, pendant la durée d'une vie de travail ;
- les VLEP recommandées sur une durée de 15 minutes (VLCT-15 min) ; il s'agit de la limite de la moyenne, pondérée en fonction du temps, de la concentration atmosphérique d'un agent chimique dans la zone de respiration d'un travailleur sur une période de référence de 15 minutes pendant le pic d'exposition quelle que soit sa durée. Elle vise à protéger les travailleurs des effets néfastes sur la santé (effets toxiques immédiats ou à court terme, tels que des phénomènes d'irritation), dus à des pics d'exposition ;
- l'attribution éventuelle d'une mention « peau » lorsqu'une pénétration cutanée significative a été identifiée. Cette mention indique la nécessité de prendre en compte la voie d'exposition cutanée dans l'évaluation de l'exposition et, le cas échéant, de mettre en œuvre des mesures de prévention appropriées (telles que le port de gants de protection). En effet, la pénétration cutanée des substances n'est pas prise en compte pour la détermination des niveaux de valeurs limites atmosphériques et peut donc potentiellement entraîner des effets sanitaires indépendamment du respect de ces dernières ;

⁵ Pour plus de détails se reporter au document de référence pour la construction et la mesure de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel. Maisons-Alfort: Anses; 2014. 122 p.

- l'attribution éventuelle d'une mention « ototoxique » signalant un risque d'atteinte auditive en cas de co-exposition au bruit et à la substance en dessous des limites d'exposition recommandées afin que les préventeurs mettent en place des mesures appropriées (collective, individuelle et médicale).

Avis de l'Anses

Saisines n° 2007-SA-0432, 2012-SA-223, 2012-SA-0224, 2010-SA-0316, 2012-SA-0083

Éléments de proposition pour fixer des VLEP

- Tableau n°1 : Tableau de synthèse relatif aux recommandations de VLEP-8h

	Trichloroéthylène	DnBP	BBzP	EGEE / EGEEA	Butan-1-ol
VLEP-8h	VLEP-8h pragmatique ⁶ de 40 mg.m ⁻³ (soit 7 ppm)	2 mg.m ⁻³	13 mg.m ⁻³	1 ppm (soit 3,75 mg.m ⁻³ pour l'EGEE et 5,49 mg.m ⁻³ pour l'EGEEA)	Aucune ⁷
Etude-clé Effet critique	Maltoni et al. (1988) ⁸ , néphrotoxicité	Lehmann et al. (2004) ⁹ , diminution de la concentration de testostérone testiculaire chez le fœtus suite à une exposition <i>in utero</i>	NTP (1997) ¹⁰ , altération des organes reproducteurs et de la fertilité	Barbee et al. 1984 ¹¹ , hématotoxicité	-
Point de départ	NOAEC _{ADJ} de 87,5 ppm (après ajustement temporel du NOAEC de 100 ppm retenu à partir de l'étude animale par inhalation) ;	NOAEL _{HEC inhalé} de 17,6 mg.m ⁻³ (calculé après ajustement allométrique et extrapolation voie à voie à partir du NOAEL de 10 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ identifié pour une administration par voie orale chez le rat dans l'étude)	NOAEL _{HEC inhalé} de 352,6 mg.m ⁻³ (calculé après ajustement allométrique et extrapolation voie à voie à partir du NOAEL identifié de 200 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour une administration par voie orale chez le rat dans l'étude)	NOAEL de 100 ppm (étude subchronique chez des lapins par inhalation)	-
Facteurs d'ajustement	FA = FA _A * FA _H = 2.5 * 5 (variabilités inter et intra- espèces)	FA = FA _A * FA _H = 3 * 3 (variabilités inter et intra- espèces)	FA = FA _A * FA _H * FA _S = 3 * 3 * 3 (variabilités inter et intra- espèces, transposition)	FA = FA _A * FA _H * FA _S = 3*10*3 (variabilités inter et intra- espèces, transposition)	-

⁶ La VLEP-8h pragmatique recommandée n'a pas pour objectif de protéger des effets cancérigènes du TCE qui est considéré dans l'expertise comme un cancérigène sans seuil d'effet mais constitue un outil pour limiter les niveaux d'exposition sur les lieux de travail.

⁷ Pas de recommandation de VLEP-8h en l'absence d'effet systémique spécifique constaté à moyen ou long terme à partir des données disponibles

⁸ Maltoni C, Lefemine G, Cotti G, et al. (1988). Long-term carcinogenicity bioassays on trichloroethylene administered by inhalation to Sprague-Dawley rats and Swiss mice and B3C6F1 mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 534: 316–342.

⁹ Lehmann KP, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW (2004). Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci.*;81(1):60-8. Epub 2004 May 12.

¹⁰ NTP. 1997. Toxicology and carcinogenesis studies of butyl benzyl phthalate in F344/N rats (feed studies). Report No. 458, NIH publication No. 97-3374. (National Toxicology Program, USA) 195p.

¹¹ Barbee SJ, Terrill JB, DeSousa DJ, Conaway CC (1984): Subchronic inhalation toxicology of ethylene glycol monoethyl ether in the rat and rabbit. *Environmental Health Perspectives* 57: 157-163.

Avis de l'Anses

Saisines n° 2007-SA-0432, 2012-SA-223, 2012-SA-0224, 2010-SA-0316, 2012-SA-0083

	Trichloroéthylène	DnBP	BBzP	EGEE / EGEEA	Butan-1-ol
			subchronique à chronique)	subchronique à chronique)	

- **Tableau n°2 : Tableau de synthèse relatif aux recommandations de VLCT-15min et des mentions à attribuer**

	Trichloroéthylène	DnBP	BBzP	EGEE / EGEEA	Butan-1-ol
VLCT-15 min	Recommandation de ne pas dépasser sur 15 minutes la concentration correspondant à 5 fois celle de la VLEP-8h ¹² soit une VLCT-15 min pragmatique de 200 mg.m ⁻³ (environ 35 ppm)	Recommandation de ne pas dépasser sur 15 minutes la concentration correspondant à 5 fois celle de la VLEP-8h soit une VLCT-15 min pragmatique de 10 mg.m ⁻³	Recommandation de ne pas dépasser sur 15 minutes la concentration correspondant à 5 fois celle de la VLEP-8h soit une VLCT-15 min pragmatique de 65 mg.m ⁻³	Recommandation de ne pas dépasser sur 15 minutes la concentration correspondant à 5 fois celle de la VLEP-8h soit une valeur pragmatique de 5 ppm (18,75 mg.m ⁻³ pour l'EGEE et 27,45 m.m ⁻³ pour l'EGEEA)	100 mg.m ⁻³
Etude-clé / Effet critique	-	-	-	-	Sterner et al. (1949) ¹³ , irritation oculaire
Point de départ	-	-	-	-	LOAEL de 100 ppm (soit 303 mg.m ⁻³)
Facteurs d'ajustement	-	-	-	-	FA _L = 3 (passage d'un LOAEL à un NOAEL)
Mention « peau »	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Mention « ototoxique »	Non ¹⁴	-*	-*	-*	Non

¹² Pour plus de détails, se reporter au rapport d'expertise collective en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel de décembre 2008, portant sur les recommandations relatives aux valeurs limites d'exposition professionnelle en vue de limiter l'importance et le nombre de pics d'exposition dans une journée de travail (partie 1).

¹³ Sterner, J. H., Crouch, H. C., Brockmyre, H. F., Cusack, M. (1949). A ten year study of butyl alcohol exposure. Am Ind Hyg Assoc 10, 53-59.

¹⁴ Pour plus de détails, se reporter au « rapport d'expertise collective en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel » relatif à l'application aux substances déjà expertisées par le CES VLEP du document méthodologique pour prévenir des effets de la coexposition professionnelle au bruit et aux substances chimiques de juillet 2013

Avis de l'Anses

Saisines n° 2007-SA-0432, 2012-SA-223, 2012-SA-0224, 2010-SA-0316, 2012-SA-0083

-* le DnBP, le BBzP, l'EGEE et l'EGEEA n'ont pas fait l'objet d'une évaluation spécifique par le CES-VLEP quant à la nécessité d'attribuer une mention « ototoxique » ; cependant dans la mesure où les données de la littérature ne mettent pas en évidence d'ototoxicité pour ces substances, l'attribution de la mention « ototoxique » ne s'avère a priori pas pertinente.

Le tableau n°3 présente de façon synthétique les méthodes recommandées pour la mesure des expositions dans l'air des lieux de travail.

En effet, le CES-VLEP évalue les méthodes de référence applicables pour la mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail. La qualité de ces méthodes et leur applicabilité à la mesure des expositions aux fins de comparaison à une VLEP ont été évaluées notamment sur leur conformité aux exigences de performance de la NF EN 482¹⁵ et de leur niveau de validation. Suite à cette évaluation, les méthodes peuvent être classées en différentes catégories :

- catégorie 1A : méthode permettant la mesure d'une VLEP contraignante. La méthode est reconnue et validée (l'ensemble des critères de performance de la NF-EN 482 sont satisfaits) ;
- catégorie 1B : méthode permettant la mesure d'une VLEP contraignante sous conditions de préciser quelques points de la méthode (une grande majorité des critères de performance de la NF-EN 482 sont satisfaits) ;
- catégorie 2 : méthode permettant la mesure d'une VLEP indicative. Il manque des données pour que la méthode puisse être validée ;
- catégorie 3 : la méthode n'est pas recommandée et ne doit pas être utilisée à des fins de comparaison aux VLEP.

Il est à noter que l'évaluation des méthodes de mesure pour le trichloroéthylène, le 2-éthoxyéthanol et son acétate a été effectuée selon le document de référence du CES-VLEP en vigueur en 2010-2013. Les méthodes étaient classées, en fonction de leur conformité à la norme NF EN 482, selon deux catégories :

- la catégorie 1 pour les méthodes validées : la majorité des critères de validation était satisfaite (étendue de mesure, incertitudes, sensibilité, conservation des prélèvements...)
- la catégorie 2 pour les méthodes indicatives : des critères majeurs de validation n'étaient pas précisés dans les protocoles ou pas suffisamment explicités.

Ces trois tableaux s'appuient sur les rapports d'expertise collective spécifiques à chaque substance (répertoriés en section 2 de l'avis) qui détaillent le profil toxicologique de la substance, les méthodes de construction des valeurs recommandées, l'évaluation de la pertinence des mentions « peau » et « ototoxique » ainsi que l'évaluation des méthodes de mesure recommandées.

¹⁵ NF EN 482 : Exposition sur les lieux de travail – Exigences générales concernant les performances des procédures de mesure des agents chimiques.

Éléments de proposition pour fixer une méthode de mesure

Tableau n°3 : Tableau de synthèse des méthodes de mesure recommandées dans l'air des lieux de travail

Substance concernée	Méthode	Protocoles similaires	Catégorie		
			pour contrôle technique réglementaire de la		pour le suivi des expositions court terme
			VLEP-8h	VLCT-15min ¹⁶	
Trichloroéthylène	Méthode 1 : Prélèvement actif sur tube de charbon actif – désorption CS ₂ – analyse par GC/FID	INRS MétroPol 029 : 2009 -NIOSH 1022: 1994 - OSHA 1001: 1999 -MTA/MA-013/R87 : 1987 - MTA/MA-045/A00 : 2000 -BGI 505-65 : 2005 -BGIA 6600 : 2000 MDHS 96 ⁽¹⁷⁾ :2000 -AFNOR NF ISO 16200 -1 : 2001 ⁽¹⁷⁾ -AFNOR NF X 43-267 : 2004 ⁽¹⁷⁾	1		
DnBP	Méthode 2 : prélèvement actif sur tube OVS – désorption toluène – analyse par GC/FID	OSHA 104 : 1994	1 B <u>Si présence uniquement phase gazeuse</u>		
	Méthode 5 : prélèvement actif sur une membrane en acétate de cellulose suivie d'un tube de gel de silice – désorption méthanol – analyse par HPLC/UV	IFA 8387 : 2009 - DFG méthode 2 : 2006	2	1 B	
	<u>Si présence d'une phase mixte (aérosol + gaz) ou aérosol</u>				
	Méthode 3 : Prélèvement sur membrane en ester de cellulose - Désorption dans CS ₂ - Analyse par GC/FID	NIOSH NMAM 5020	3 (méthode non recommandée)	1B	
<u>Si présence phase aérosol uniquement</u>					

¹⁶ Les critères de validation et de performance pour les méthodes destinées au suivi des VLCT sont définis par la norme NF EN 482 sur un intervalle de 0,5 à 2 fois la VLCT. La réglementation française impose, dans le cas de contrôle technique de la valeur limite, que la méthode de mesure permette de mesurer le dixième de la VLCT-15min (Arrêté du 15 décembre 2009 relatif aux contrôles techniques des valeurs limites d'exposition professionnelle sur les lieux de travail et aux conditions d'accréditation des organismes chargés des contrôles, publié au JO du 17 décembre 2009). De ce fait, lorsque la méthode ne permet pas de mesurer le dixième de la VLCT-15min, celle-ci ne peut pas être classée en catégorie 1A ni 1B à des fins de contrôle réglementaire de la VLCT-15min. Par contre, elle pourrait être classée en catégorie 1A ou 1B uniquement à des fins d'évaluation de l'exposition professionnelle.

¹⁷ Ces protocoles sont destinés au prélèvement et dosage de la plupart des composés organiques volatils, et définissent des exigences générales à satisfaire pour valider la méthode de prélèvement et d'analyse. Les protocoles MDHS 96, NF ISO 16200-1 et AFNOR NF X 43-267 renvoient au protocole NIOSH 1022 pour le prélèvement et l'analyse du trichloroéthylène.

Avis de l'Anses
Saisines n° 2007-SA-0432, 2012-SA-223, 2012-SA-0224, 2010-SA-0316, 2012-SA-0083

Substance concernée	Méthode	Protocoles similaires	Catégorie		
			pour contrôle technique réglementaire de la		pour le suivi des expositions court terme
			VLEP-8h	VLCT-15min ¹⁶	
BBzP	Aucune méthode de mesure n'est recommandée : les deux méthodes de mesures recensées ont été classées en catégorie 3				
EGEE / EGEEA	Méthode 1 : Prélèvement actif sur tube de charbon actif- désorption solvant – analyse par GC/FID	OSHA 79 : 1990 - OSHA 53 : 1985 - NIOSH 1403, issue 3 : 2003 - INRS MetroPol 022/V01 : 2009 - INSHT MTA/MA-017/A89 : 1989 <i>MDHS 96 : 2000¹⁸ - Afnor NF X 43-267 : 2004¹⁸ - Afnor NF ISO 16200-1 : 2001⁽¹⁸⁾</i>	1		
Butan-1-ol	Méthode 3 : Prélèvement actif sur tube charbon actif - Désorption isopropanol/CS ₂ - Analyse GC/FID	NIOSH 1401 (1984, rév. 1994), NIOSH 1405 (2003), IRSST90-1 (1988), OSHA 7 (2000), MDHS 96 (2000), ISO 16200-1 (2001)	-	1 B	
	Méthode 4 : Prélèvement actif sur tube charbon actif - Désorption isobutanol/CS ₂ - Analyse GC/FID	MTA/MA-016/A89 (1989)	-	1 B	
	Méthode 5 : Prélèvement actif sur tube charbon actif - Désorption dichlorométhane/CS ₂ - Analyse GC/FID	MétroPol 077/V01.02 (2013)	-	1 B	

¹⁸ Ces protocoles sont destinés au prélèvement et dosage de la plupart des composés organiques volatils. Le protocole MDHS 96, la norme Afnor NF X 43-267 et la norme NF ISO 16200-1 renvoient au protocole NIOSH 1403 pour la mise en œuvre de la méthode et les données de validation.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

Conformément aux conclusions de son Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Expertise en vue de la fixation de valeurs limites à des agents chimiques en milieu professionnel », l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) recommande pour :

- **le trichloroéthylène (TCE)**

- la fixation d'une VLEP-8h pragmatique de 40 mg.m^{-3} (soit 7 ppm) ; La VLEP-8h pragmatique recommandée n'a pas pour objectif de protéger des effets cancérogènes du TCE mais constitue un outil pour limiter les niveaux d'exposition sur les lieux de travail.
- de ne pas dépasser sur 15 minutes la concentration correspondant à 5 fois celle de la VLEP-8h soit une VLCT-15 min pragmatique de 200 mg.m^{-3} (environ 35 ppm) ;
- d'attribuer la mention « peau » ;
- la méthode de mesure, classée en catégorie 1 pour les VLEP recommandées, consistant à effectuer un prélèvement par pompage sur tube de charbon actif, une désorption par le disulfure de carbone puis une analyse par chromatographie gazeuse avec détection par ionisation de flamme (GC/FID) ;

- **le di-n-butyl-phtalate (DnBP)**

- la fixation d'une VLEP-8h de 2 mg.m^{-3} ;
- de ne pas dépasser sur 15 minutes la concentration correspondant à 5 fois celle de la VLEP-8h soit une VLCT-15 min pragmatique de 10 mg.m^{-3} ;
- trois méthodes de mesure selon la forme physique sous laquelle se trouve le DnBP et selon le type de VLEP à contrôler :
 - lorsque le DnBP est présent sous la seule forme gazeuse : la méthode consistant à effectuer un prélèvement actif sur tube OVS, suivi d'une désorption dans le toluène puis d'une analyse par GC/FID. Cette méthode est partiellement validée et classée en catégorie 1B pour le contrôle technique de la VLEP-8h et de la VLCT-15min pragmatique.
 - lorsque le DnBP est présent sous forme d'une phase mixte ou d'un aérosol seul : la méthode consistant à effectuer un prélèvement actif sur une membrane en acétate de cellulose suivie d'un tube de gel de silice, suivi d'une désorption dans le méthanol puis d'une analyse par HPLC/UV. Cette méthode est indicative et classée en catégorie 2 pour la VLEP-8h et partiellement validée et classée en catégorie 1B pour la VLCT-15min pragmatique.
 - lorsque le DnBP est présent sous forme d'un aérosol seul : la méthode consistant à effectuer un prélèvement sur membrane en ester de cellulose, suivi d'une désorption dans le disulfure de carbone puis une analyse par GC/FID. Cette méthode est partiellement validée et classée en catégorie 1B uniquement pour le suivi des expositions court terme. Elle n'est pas recommandée pour le suivi de la VLEP-8h ni de la VLCT-15min pragmatique.

- **le butylbenzyl-phthalate (BBzP)**
 - la fixation d'une VLEP-8h de 13 mg.m⁻³ ;
 - de ne pas dépasser sur 15 minutes la concentration correspondant à 5 fois celle de la VLEP-8h soit une VLCT-15 min pragmatique de 65 mg.m⁻³ ;
 - d'attribuer la mention « peau » ;
 - aucune méthode de mesure ;
- **le 2-éthoxyéthyle (EGEE) et l'acétate de 2-éthoxyéthyle (EGEEA)**
 - la fixation d'une VLEP-8h de 1 ppm (soit 3,75 mg.m⁻³ pour l'EGEE et 5,49 mg.m⁻³ pour l'EGEEA) ;
 - de ne pas dépasser sur 15 minutes la concentration correspondant à 5 fois celle de la VLEP-8h soit une VLCT-15 min pragmatique de 5 ppm (18,75 mg.m⁻³ pour l'EGEE et 27,45 mg.m⁻³ pour l'EGEEA) ;
 - d'attribuer d'une mention « peau » ;
 - la méthode de mesure consistant à effectuer un prélèvement par pompage sur tube de charbon actif, suivi d'une désorption solvant puis d'une analyse par GC/FID. Cette méthode est classée en catégorie 1 pour les VLEP recommandées ;
- **le butan-1-ol**
 - la fixation d'une VLCT-15min de 100 mg.m⁻³ ;
 - trois méthodes de mesure classées en catégorie 1B pour la VLCT-15 min recommandée (à la fois pour le suivi technique réglementaire et le suivi des expositions) consistant à effectuer un prélèvement actif sur tube charbon actif, suivi d'une désorption soit isopropanol/disulfure de carbone soit isobutanol/disulfure de carbone soit encore dichlorométhane/disulfure de carbone, puis d'une analyse GC/FID.

Par ailleurs, l'Anses tient à rappeler que :

- la substitution des substances cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction par des substances ou des procédés moins nocifs est une démarche prioritaire pour la prévention du risque chimique sur les lieux de travail en France; cette démarche prioritaire de substitution doit donc être appliquée au trichloroéthylène¹⁹, au di-n-butyl-phthalate, au butylbenzyl-phthalate, au 2-éthoxyéthanol et à l'acétate de 2-éthoxyéthyle^{20,21};

¹⁹ Le trichloroéthylène est classé cancérigène de catégorie 1B (Carc.1B ; H350 – peut provoquer le cancer) selon le règlement (CE) N°1272/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges et cancérigène de catégorie 1 (cancérigène pour l'Homme) par le Centre International de Recherche sur le Cancer.

²⁰ Ces 4 substances sont classées toxiques pour la reproduction de catégorie 1B (Repr. 1B ; H360 – peut nuire à la fertilité ou au fœtus) selon le règlement (CE) N°1272/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges. Le DnBP et le BBzP sont également classés en tant que potentiel perturbateurs endocriniens de catégorie 1 (cf rapport du BKH de 2002, http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/strategy/substances_en.htm et du DHI de 2007, http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/final_report_2007.pdf).

²¹ Il est à noter la présence sur le site « substitution-cmr » de l'Anses d'exemples de substitution pour les substances concernées par cet avis ; l'Anses rappelle qu'elle ne réalise aucune évaluation des risques des substituts identifiés sur le site. Ces exemples de substitution ne doivent pas être lus comme des modèles de substitution directs par les substances citées mais uniquement comme une incitation à engager une démarche de substitution.

- lorsque la substitution est impossible, l'exposition doit être réduite à un niveau aussi bas que techniquement possible ;
- Les femmes enceintes ou allaitantes ne doivent pas être affectées ou maintenues à un poste de travail exposant à des agents toxiques pour la reproduction ;
- Les travailleurs doivent être formés à la sécurité et informés des risques pour la santé et la sécurité des agents chimiques dangereux se trouvant sur leur lieu de travail et plus spécifiquement des effets des substances toxiques pour la reproduction notamment afin de sensibiliser les femmes quant à la nécessité de déclarer le plus précocement possible leur état de grossesse.

Enfin l'Anses recommande de poursuivre ces travaux d'expertise par le développement de valeurs biologiques pouvant être utilisées dans le cadre de la surveillance biologique des expositions en milieu professionnel pour le trichloroéthylène, le di-n-butyl-phtalate, le butylbenzyl-phtalate, le 2-éthoxyéthanol et l'acétate de 2-éthoxyéthyle. Ces valeurs viendraient ainsi compléter le dispositif réglementaire français de prévention du risque chimique sur les lieux de travail.

Dr Roger GENET

MOTS-CLÉS

VLEP, valeurs limites, niveaux d'exposition, milieu professionnel, agents chimiques, expertise, effets sur la santé, métrologie, méthodes de mesure, lieu de travail, trichloroéthylène, 2-éthoxyéthanol, acétate de 2-éthoxyéthyle, di-n-butyl-phtalate, butylbenzyl-phtalate, butan-1-ol.

OEL, limit values, exposure levels, occupational, chemicals, expertise, health effects, metrology, measurement methods, workplace, trichloroethylene, 2-ethoxyethanol, 2-ethoxyethyl acetate, di-n-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate, butan-1-ol.

ANNEXE

**Eléments d'information complémentaires
pouvant être utiles aux gestionnaires des risques**

- **pour le trichloroéthylène (TCE)**

Usages et expositions professionnelles

Le TCE est employé essentiellement comme solvant (dégraissage des pièces métalliques, formulation d'adhésifs, de peintures, de vernis, d'encres, de colles...) et comme intermédiaire réactionnel²². Les autres usages renseignés concernent l'utilisation comme solvant pour le nettoyage à sec des textiles, la tannerie et l'industrie pharmaceutique. En 2003, 67% du TCE étaient utilisés comme produit intermédiaire.

Le TCE est produit ou importé en Europe entre 10 000 et 100 000 tonnes par an, essentiellement pour un usage intermédiaire de synthèse (d'après les informations disséminées sur le site de l'ECHA²³). D'après le site Internet du Ministère de l'économie des finances et de l'industrie, de 2004 à 2006, au niveau mondial, les exportations françaises de trichloroéthylène sont passées de 10 724 tonnes à 2 512 tonnes alors que les importations se sont stabilisées autour de 7 000 tonnes²³.

En France, selon les résultats de l'enquête Surveillance Médicale des Expositions aux Risques Professionnels (Sumer) de 2010, il semble que le nombre de salariés exposés au TCE ait été divisé par 3 entre 2003 et 2010, passant de 153 600 à 59 100, grâce à l'utilisation de produits de substitution tels que les produits lessiviels comme dégraissants²⁴.

Le TCE est inscrit à l'annexe XIV du règlement REACH n° 1907/2006/CE (entrée n°15), ce qui signifie que toute utilisation sur le marché européen est sujette à une demande préalable d'autorisation auprès de l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA).

Dix-neuf demandes d'autorisation ont été déposées. A défaut d'autorisation accordée, toute utilisation de la substance est interdite depuis le 21 avril 2016 sauf exemptions définies par le règlement REACH²⁵ (tel que l'usage comme intermédiaire de synthèse isolé). L'usage du TCE en tant que solvant est ainsi strictement encadré par la procédure d'autorisation depuis avril 2016.

Les détenteurs d'une autorisation doivent satisfaire aux exigences de la décision et indiquer le numéro d'autorisation sur l'étiquette avant de mettre la substance (ou le mélange contenant la substance) sur le marché. Les utilisateurs en aval d'une substance autorisée doivent également se conformer à la décision et notifier à l'ECHA l'utilisation de la substance dans un délai de trois mois suivant la première livraison de la substance.

²² INERIS, 2007. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : TRICHLOROETHYLENE, 33p. (<http://rsde.ineris.fr/>).

²³ <https://echa.europa.eu/fr/brief-profile/-/briefprofile/100.001.062>, consulté le 30 mars 2017

²⁴ Léonard M. Les expositions aux produits chimiques cancérigènes en 2010. Références en Santé au Travail n° 135. Septembre 2013.

²⁵ Voir articles 2 et 56 du règlement REACH

- **pour le di-n-butyl-phtalate (DnBP) et pour le benzylbutyl-phtalate (BBzP)**

Usages et expositions professionnelles du di-n-butyl-phtalate (DnBP)

La production et/ou importation du DnBP est comprise entre 1 000 et 10 000 tonnes par an dans l'Union européenne et sert notamment à la fabrication de produits chimiques de laboratoire, d'explosifs, de polymères pour la fabrication de matériaux plastiques, de produits de nettoyage lors de la fabrication de produits métalliques et en caoutchouc ainsi qu'en tant qu'intermédiaire de synthèse²⁶.

Les données récentes montrent toutefois que la production de DnBP en Europe est en constante diminution depuis 1994. En 2008, la production de DnBP ne représentait que 1% de la production totale de phtalates en Europe de l'Ouest, qui s'élève à un million de tonnes par an d'après le site de l'ECPI (European Council for Plasticisers and Intermediates) (European Council for Plasticisers and Intermediates 2013). Au total, 42 secteurs d'activités ont été recensés comme étant potentiellement concernés par le DnBP en France. L'utilisation la plus importante du DnBP est en tant que plastifiant dans les résines et les polymères tels que l'acétate de polyvinyle (PVA)²⁷. Le DnBP est également utilisé comme plastifiant dans les encres d'impression pour l'industrie du papier, les adhésifs, comme plastifiant et/ou solvant dans les mastics, les enduits, les peintures à la nitrocellulose (notamment dans l'automobile et pour les meubles), les revêtements et les fibres de verre²⁸.

Il n'existe pas de données précises en France concernant le nombre de travailleurs exposés au DnBP. L'enquête Surveillance médicale des expositions aux risques professionnels (Sumer) de 2010, rapporte un nombre de salariés exposés aux phtalates en général. Selon les résultats de cette enquête, 58 100 salariés déclarent être exposés aux phtalates soit 0,3% de l'effectif total ayant répondu au questionnaire dont 16 900 salariés déclarant être exposés plus de 20 heures par semaine²⁹.

Usages et expositions professionnelles du benzylbutyl-phtalate (BBzP)

La production et/ou importation du BBzP est comprise entre 1 000 et 10 000 tonnes par an en Europe et sert notamment à la production d'adhésifs, de produits d'étanchéité et de revêtements³⁰.

Le BBzP est principalement utilisé comme agent de plastification dans la fabrication de colles, vernis, peintures, mastics, encres. En Europe, 90% de l'utilisation concerne la production de PVC et certains polymères (revêtements de sol, emballages alimentaires, peintures plastiques...)³¹.

²⁶ Agence Européenne des Produits Chimiques (ECHA). Site de dissémination des données d'enregistrement, <https://www.echa.europa.eu/web/guest/brief-profile/-/briefprofile/100.001.416>, consulté le 30 mars 2017

²⁷ ANSES. "Connaissances Relatives à la Réglementation, à l'identification, aux propriétés chimiques, à la production et aux usages des composés de la famille des Phtalates (Tome 1)," Mars 2015. <https://www.anses.fr/fr/system/files/SUBCHIM2009sa0331Ra-104.pdf>

²⁸ Commission européenne (CE) Joint Research Centre - Institute for Health and Consumers Protection European Chemicals Bureau (ECB). (2003) European Union Risk Assessment Report: Dibutyl phtalate. Volume 29. (Luxembourg : Office for official publications of the European Communities L - 2985). <https://echa.europa.eu/documents/10162/04f79b21-0b6d-4e67-91b9-0a70d4ea7500>

²⁹ DARES. (2015). Les exposition aux risques professionnels – Les produits chimiques. Enquête SUMER 2010 Direction de l'animation de la recherche, des études et des statistiques, Paris. 273 p. http://dares.travail-emploi.gouv.fr/IMG/pdf/Synthese_Stat_no_13_-_Les_expositions_aux_produits_chimiques.pdf

³⁰ Agence Européenne des Produits Chimiques (ECHA). Site de dissémination des données d'enregistrement, <https://www.echa.europa.eu/fr/web/guest/brief-profile/-/briefprofile/100.001.475>, consulté le 19/12/2016

³¹ European Commission (EC) 2007. European Union Risk assessment report. Benzyl Butyl Phtalate, volume 76. (European Commission, Luxembourg). 274 p. <https://echa.europa.eu/documents/10162/bad5c928-93a5-4592-a4f6-e02c5e89c299>

Les données récentes montrent toutefois que la production de BBzP en Europe est en constante diminution au cours des dernières années. Au total, 39 secteurs d'activités ont été recensés comme étant potentiellement concernés par le DnBP en France³².

Il n'existe pas de données précises en France concernant le nombre de travailleurs exposés au BBzP. L'enquête Surveillance médicale des expositions aux risques professionnels (Sumer) de 2010, rapporte un nombre de salariés exposés aux phtalates en général. Selon les résultats de cette enquête, 58 100 salariés déclarent être exposés aux phtalates soit 0,3% de l'effectif total ayant répondu au questionnaire dont 16 900 salariés déclarant être exposés plus de 20 heures par semaine³³.

Le DnBP et le BBzP sont inscrits à l'annexe XIV du règlement REACH n° 1907/2006/CE et sont donc concernés par la procédure d'autorisation.

Plusieurs demandes d'autorisation ont été déposées par l'industrie pour le DnBP, afin de permettre une utilisation notamment dans la production d'anhydride maléique, dans la fabrication d'agents de propulsion, dans l'électronique (fabrication de condensateurs et de capteurs) et dans la fabrication de peintures à usage militaire. Tout autre usage n'ayant pas fait l'objet d'une demande d'autorisation est interdit en Europe depuis le 21 février 2015 sauf exemptions définies par le règlement REACH. Aucune demande d'autorisation n'a été déposée par l'industrie pour le BBzP, signifiant que tout usage du BBzP est interdit en Europe depuis le 21 février 2015 sauf exemptions définies par le règlement REACH.

La procédure d'autorisation ne couvre pas les articles importés en Europe : plusieurs articles ont été notifiés à l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA) comme contenant ces substances.

Ces 2 substances sont également concernées par l'entrée 51 de l'annexe XVII du règlement REACH, visant à restreindre leurs utilisations dans les jouets et articles de puériculture à plus de 0,1 % en masse des matières plastiques composant ces articles. L'Agence européenne des produits chimiques (ECHA) et les autorités danoises ont également proposé une restriction plus large aux articles exposant la population générale à quatre phtalates incluant le DnBP et le BBzP³⁴.

- **pour le 2-éthoxyéthanol (EGEE) et l'acétate de 2-éthoxyéthyle (EGEEA) :**

Usages et expositions professionnelles

L'EGEE est produit ou importé en Europe entre 100 et 1 000 tonnes par an, essentiellement comme produit chimique de laboratoire ou intermédiaire de synthèse³⁵. A ce jour, l'EGEEA est pré-enregistré mais pas enregistré dans le cadre du règlement REACH n°1907/2006/CE.

L'inventaire des agents chimiques cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques de 2005 de l'institut national de recherche et de sécurité (INRS) indique une consommation estimée très faible voire nulle pour l'EGEE suite à la mise en œuvre en France d'une politique de substitution très active des éthers de glycol reprotoxiques³⁶.

³² ANSES. "Connaissances Relatives à la Réglementation, à l'identification, aux propriétés chimiques, à la production et aux usages des composés de la famille des phtalates (Tome 1)," Mars 2015. <https://www.anses.fr/fr/system/files/SUBCHIM2009sa0331Ra-104.pdf>.

³³ DARES. (2015). Les expositions aux risques professionnels – Les produits chimiques. Enquête SUMER 2010 Direction de l'animation de la recherche, des études et des statistiques, Paris. 273 p. http://dares.travail-emploi.gouv.fr/IMG/pdf/Synthese_Stat_no_13_-_Les_expositions_aux_produits_chimiques.pdf

³⁴ La procédure d'instruction par les comités d'évaluation de l'ECHA est en cours.

³⁵ <https://echa.europa.eu/fr/brief-profile/-/briefprofile/100.003.459> , Consulté le 30 mars 2017.

³⁶ INRS – Hygiène et sécurité au travail – cahier de notes documentaires – 4^{ème} trimestre 2006-205-p83-96.

Compte tenu de leur classification comme toxique pour la reproduction en catégorie 1B (classification R1B selon la réglementation européenne³⁷), l'EGEE et l'EGEEA ont été identifiées comme substances très préoccupantes et sont inscrites à la liste candidate dans le cadre du règlement REACH.

- **pour le butan-1-ol**

Le butan-1-ol fait l'objet d'une classification harmonisée et est notamment classé comme irritant de catégorie 2 et provoquant des lésions oculaires graves selon la réglementation de l'Union européenne³⁷.

Usages et expositions professionnelles

Le butan-1-ol est produit ou importé en Europe entre 100 000 et 1 000 000 tonnes par an. Cette substance est utilisée pour la fabrication de lubrifiants et graisses, produits de revêtement, produits de nettoyage et de lavage, produits anti-gel, adhésifs et mastics, vernis, cires et peintures au doigt³⁸.

Selon le panorama de l'utilisation des solvants en France fin 2004 de l'INRS³⁹, parmi les nombreux alcools utilisés (représentant en 2004 une consommation globale de 126 600 tonnes), le butan-1-ol représente 19% de la consommation des alcools après l'éthanol (qui représente 50% de la consommation des alcools). Dans le secteur de la formulation de préparations solvantées, le butan-1-ol est ainsi utilisé en 2004 en France pour 61% dans les produits cosmétiques (dont les parfums), 32 % dans les peintures, vernis et encres et 7% dans les produits agrochimiques.

³⁷ règlement (CE) N°1272/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006

³⁸ <https://echa.europa.eu/fr/brief-profile/-/briefprofile/100.000.683> Consulté le 30 mars 2017

³⁹ INRS – Hygiène et sécurité au travail – cahier de notes documentaires – 2^{ème} trimestre 2005-199-p65-97.

Expertise en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel

**Evaluation des effets sur la santé et des méthodes de mesure des niveaux
d'exposition sur le lieu de travail pour le
Di-n-butyl-phtalate [N° CAS : 84-74-2]**

**Mission permanente VLEP
Saisine n°2012-SA-0223**

RAPPORT d'expertise collective

**Comité d'experts spécialisé « Expertise en vue de la fixation de valeurs limites à
des agents chimiques en milieu professionnel »**

Décembre 2015

Mots clés

VLEP, valeurs limites, niveaux d'exposition, milieu professionnel, agents chimiques, effets sur la santé, métrologie, méthodes de mesure, lieux de travail, di-n-butyl-phtalate, phtalate de dibutyle, DnBP, reprotoxique, tératogène

OEL, limit values, exposure levels, occupational, chemical agents, health effects, metrology, measurement methods, workplaces, di-n-butyl-phthalate, DnBP, reprotoxic, teratogen

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.

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis pour la partie « effets sanitaires » par le GT « effets sanitaires » dont la composition est la suivante :

GRUPE DE TRAVAIL « EFFETS SANITAIRES » (2010-2013)

Président

M. Stéphane BINET – Chef du laboratoire de cancérogenèse et toxicité du développement (Institut National de Recherche et de Sécurité INRS) – Compétences : toxicologie

Membres

M. Marc BARIL – Professeur associé à l'université de Montréal – Compétences : Toxicologie, chimie

Mme Irina CANU – Epidémiologiste à l'INVS – Compétences : Epidémiologie

Mme Carole DUPLAINE – Toxicologue (Sud Loire santé au travail) habilitée intervenant en prévention des risques professionnels (IPRP) - Compétences : toxicologie

M. Christian LAURENT – Consultant indépendant – Compétences : toxicologie génétique, biosurveillance

M. Paolo LAURIOLA – Médecin-épidémiologiste ARPA Emilia-Romagna – Compétences : épidémiologie, médecine, toxicologie

Mme Caroline MAISONNEUVE – Toxicologue DGA – Compétences : toxicologie, évaluation des risques, élaboration de valeurs de références ; a démissionné le 13/02/2013

Mme Mireille MATRAT – Médecin du travail Université Paris XII – Compétences : médecine du travail, toxicologie, épidémiologie

M. Fabrizio PARISELLI – Toxicologue CNRS – Compétences : toxicologie

M. Jean-Paul PAYAN – Chercheur INRS – Compétences : toxicologie, pharmacocinétique

GROUPE DE TRAVAIL « MÉTROLOGIE » (2010-2013)

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis pour la partie « évaluation des méthodes de mesures dans l'air des lieux de travail » par le GT métrologie dont la composition est la suivante :

Président

M. Raymond VINCENT : Chargé de mission à la Direction Déléguée aux Applications (Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS)) – Compétences : hygiène industrielle, métrologie des polluants dans l'air des lieux de travail

Membres

Mme Ingrid ALLIO – Responsable du département air et du laboratoire de microbiologie au sein du laboratoire d'analyses de surveillance et d'expertise de la marine (LASEM) à Brest – Compétences : Analyse, Chimie, Métrologie atmosphérique air des lieux de travail

M. Olivier BARBE – Responsable adjoint du laboratoire de chimie (CARSAT Normandie) – Compétences : chimiste, métrologie des polluants dans l'air des lieux de travail

M. Eddie FAURE – Responsable technique dans le domaine de la qualité de l'air au Laboratoire Central de la Préfecture de Police (LCPP) – Compétences : Analyse, Chimie, Métrologie atmosphérique air des lieux de travail

M. Roger GROSJEAN – Chef du laboratoire de toxicologie industrielle du Ministère du travail Belge – Compétences : Hygiène industrielle, Chimie, Expologie, Métrologie atmosphérique air des lieux de travail

M. Pierre Louis LAMBERT – Responsable du laboratoire de chimie (CARSAT Aquitaine) : Compétences : chimiste, métrologie des polluants dans l'air des lieux de travail

M. Benoît OURY – Responsable d'études (laboratoire de chimie analytique organique, INRS) – Compétences : chimiste, métrologie des polluants dans l'air des lieux de travail, chimie organique

M. Davy ROUSSET : Responsable du laboratoire d'analyse inorganique et de caractérisation des aérosols (INRS) – Compétences : métrologie des polluants dans l'air des lieux de travail, chimie inorganique

M. Michel SLOIM – Ingénieur chimiste (Laboratoire Central de la Préfecture de Police (LCPP)) – Compétences : analyse *chimique*, métrologie des polluants dans l'air des lieux de travail

COMITE D'EXPERTS SPÉCIALISE (2010 -2013)

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés pour la partie « effets sanitaires » et « évaluation des méthodes de mesure » par le CES suivant :

Président

M. François PAQUET – Coordinateur de recherches (IRSN) – Compétences : radiotoxicologie, dosimétrie interne, toxicocinétique, évaluation des risques

Membres

M. Billy AMZAL – Vice-président du groupe LASER – Compétences : évaluation des risques sanitaires, modélisation.

M. Marc BARIL – Professeur associé à l'université de Montréal – Compétences : Toxicologie, chimie.

Mme Michèle Berode – Chimiste PhD (IST) – Compétences : IBE, métrologie des polluants ; a démissionné le 25/02/2013.

M. Stéphane BINET – Chef du laboratoire de cancérogenèse et toxicité du développement adjoint au chef du département Polluants et santé (INRS) – Compétences : toxicologie

M. Patrick BRETON – Expert Adjoint au chef de la division « Risques » / Ingénieur de recherche Ministère de la Défense – Compétence : Toxicologie

Mme Fatiha ELGHASSASI – Professionnelle scientifique (IARC) – Compétences : biochimie, évaluation de la cancérogenèse

M. Michel FALCY – Adjoint au chef de département « Etudes et assistance médicale et responsable du pôle toxicologie » (INRS) – Compétences : médecine du travail, toxicologie

M. Luc FONTANA – Médecin PU/PH (CHU Saint-Etienne) – Compétences : médecine et santé au travail, toxicologie

Mme Yuriko IWATSUBO – Médecin épidémiologiste (InVS) – Compétences : épidémiologie des risques professionnels

M. Jean-Pierre LEPOITTEVIN – Professeur des universités et directeur du Laboratoire de Dermatochimie (Université de Strasbourg) – Compétences : dermatochimie, allergies, immunologie

M. Renaud PERSOONS – Assistant hospitalo-universitaire (CHU Grenoble) – Compétences : toxicologie, IBE

Mme Florence PILLIERE – Conseiller médical en toxicologie (INRS) – Compétences : médecine du travail, toxicologie, IBE

M. David VERNEZ – Chef de groupe et co-directeur (ad interim) (IST) – Compétences : Hygiène industrielle

M. Claude VIAU – Professeur associé à l'université de Montréal – Compétences : Toxicologie, IBE, Hygiène industrielle, métrologie des polluants
M. Raymond VINCENT – Chargé de mission – Direction Déléguée aux Applications (INRS). Compétences : chimiste, métrologie des polluants

M. Adolf VYSKOCIL – Professeur associé à l'université de Montréal – Compétences : toxicologie, IBE, hygiène industrielle

ADOPTION DU RAPPORT PAR LE COMITE D'EXPERTS SPÉCIALISE « EXPERTISE EN VUE DE LA FIXATION DE VALEURS LIMITES À DES AGENTS CHIMIQUES EN MILIEU PROFESSIONNEL » (2014 – 2017)

Président

M. Claude VIAU – Professeur associé à l'université de Montréal – Compétences : Toxicologie, IBE, hygiène industrielle, métrologie des polluants

Membres

M. Marc BARIL – Professeur associé à l'université de Montréal – Compétences : Toxicologie, chimie ; également membre du CES « caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence »

M. Stéphane BINET – Chef du laboratoire de cancérogenèse et toxicité du développement ; adjoint au chef du département Polluants et santé (INRS) - Compétences : toxicologie

Mme Irina CANU – Epidémiologiste (InVS) - Compétences : Epidémiologie, toxicologie

Mme Anne CHEVALIER – Retraitée – Compétences : Epidémiologie ; également membre du CES « caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence »

Mme Carole DUPLAINE – Toxicologue (Sud Loire santé au travail) habilitée intervenant en prévention des risques professionnels (IPRP) - Compétences : toxicologie

Mme Perrine HOET – Professeur à l'université catholique de Louvain – Compétences : médecine, toxicologie industrielle

Mme Yuriko IWATSUBO – Médecin épidémiologiste (InVS) – Compétences : épidémiologie des risques professionnels, médecine

Mme Anne MAITRE – Professeur des universités – praticien hospitalier (PU-PH) (CHU Grenoble) ; Responsable de l'équipe « Environnement et prédiction de la santé des populations » (faculté de médecine de Grenoble) – Compétences : médecine, toxicologie, IBE, métrologie des polluants, hygiène industrielle

M. Fabrizio PARISELLI – Toxicologue (CNRS) - Compétences : toxicologie ; également membre du CES « Substances chimiques visées par les règlements REACH et CLP »

Mme Florence PILLIERE – Conseiller médical en toxicologie (INRS) – Compétences : médecine du travail, toxicologie, IBE

M. Frank RIVIERE – Médecin du travail (Service de santé des armées) – Compétences : médecine du travail, toxicologie

M. Davy ROUSSET : Responsable du laboratoire d'analyse inorganique et de caractérisation des aérosols (INRS) – Compétences : métrologie des polluants dans l'air des lieux de travail, chimie inorganique

M. David VERNEZ – Co-directeur de l'Institut universitaire romand de santé au travail (IST) (ad interim) – Compétences : Hygiène industrielle

M. Raymond VINCENT – Chargé de mission - Direction Déléguée aux Applications (INRS). Compétences : chimiste, métrologie des polluants

M. Adolf VYSKOCIL – Professeur associé à l'université de Montréal – Compétences : toxicologie, IBE, hygiène industrielle

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme Dominique BRUNET

Mme Marie-Laure COINTOT¹

Mme Mounia EI YAMANI²

Contribution scientifique

M. Christophe ROUSSELLE

Mme Amandine PAILLAT

Mme Fatoumata SISSOKO

Mme Mounia EI YAMANI

Mme Nathalie DUCLOVEL-PAME³

Secrétariat administratif

Mme Séverine BOIX

Mme Sophia SADDOKI

¹ Départ de l'Anses en janvier 2015

² Départ de l'Anses en février 2013

³ Départ de l'Anses en septembre 2014

Sommaire

Présentation des intervenants.....	3
Sigles et abréviations	25
Préambule	27
Partie A – Rapport d'évaluation des effets sur la santé	29
1. Informations générales.....	30
1.1. Identification	31
1.2. Propriétés physico-chimiques.....	31
1.3. Classification et tableaux des maladies professionnelles.....	32
2. VLEP existantes	33
2.1. Europe.....	33
2.1.1 France.....	33
2.1.2 Allemagne	33
2.1.3 Danemark	33
2.2. Etats-Unis.....	34
2.2.1 OSHA.....	34
2.2.2 ACGIH.....	34
2.2.3 NIOSH.....	34
3. Résumé de la synthèse du SCOEL.....	35
4. Cinétique et métabolisme	36
4.1. Absorption	36
4.1.1 Inhalation	36
4.1.2 Ingestion	36
4.1.3 Contact cutané	36
4.2. Distribution	36
4.3. Métabolisation	37
4.4. Excrétion	38
5. Toxicité générale.....	40
5.1. Toxicité chez l'Homme	40
5.1.1 Toxicité aiguë.....	40
5.1.2 Irritation	40
5.1.3 Sensibilisation	40
5.1.4 Toxicité chronique	41

5.1.5	Cancérogénicité	41
5.1.6	Toxicité sur la reproduction	42
5.2.	Toxicité chez l'animal	47
5.2.1	Toxicité aiguë	47
5.2.2	Irritation	47
5.2.3	Sensibilisation	47
5.2.4	Toxicité par doses répétées	47
5.2.5	Génotoxicité	53
5.2.6	Cancérogénicité	53
5.2.7	Toxicité sur la reproduction	53
5.3.	Cohérence Homme-animal et mécanisme d'action.....	67
6.	Construction des VLEP et recommandations.....	69
6.1.	Valeur Limite d'Exposition-8h	69
6.2.	Valeur Limite Court terme-15 minutes	71
6.3.	Mention peau.....	72
7.	Conclusions	73
8.	Bibliographie.....	74
Partie B – Rapport d'évaluation des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur les lieux de travail		80
1.	Utilisations professionnelles	81
2.	Présentation et discussion des méthodes de mesure du DnBP dans l'air des lieux de travail	82
2.1.	Recensement et classement des méthodes de mesure.....	82
2.2.	Discussion des méthodes de mesure	84
2.2.1	Évaluation détaillée des méthodes classées en catégorie 1B et 2.....	84
2.2.2	Explication de la classification des méthodes en catégorie 3.....	90
3.	Conclusions et recommandations	93
4.	Bibliographie.....	95
Annexe 1 : annexe de la partie B : Support technique : présentation détaillée des méthodes de mesure dans l'air des lieux de travail.....		98
Annexe 2 - Consultation publique		112
Annexe 3 : Suivi des mises à jour du rapport		113

Expertise collective : synthèse de l'argumentaire et conclusions

Relatives à « l'expertise en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel »

Portant sur l'évaluation des effets sur la santé et des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail pour le di-n-butyl-phtalate (N° CAS 84-74-2)

Ce document synthétise les travaux du comité d'experts spécialisé « expertise en vue de la fixation de valeurs limites à agents chimiques en milieu professionnel (CES VLEP), du groupe de travail « effets sanitaires » et du groupe de travail « métrologie ».

Présentation de la question posée

L'Afsset, devenue Anses en juillet 2010, a été saisie le 12 juin 2007 par la direction générale du travail afin de mener les travaux d'expertise nécessaires à la fixation de valeurs limites d'exposition professionnelle pour le di-n-butyl-phtalate.

La France dispose actuellement d'une valeur moyenne d'exposition sur 8 heures pour le di-n-butyl-phtalate de 5 mg.m^{-3} . Elle a été fixée par une circulaire du Ministère du Travail du 13 mai 1987⁴ (non parue au JO).

La direction générale du travail a demandé à l'Anses de réévaluer cette valeur et de proposer le cas échéant, de nouvelles valeurs d'exposition en milieu professionnel basées sur des considérations sanitaires pour le di-n-butyl-phtalate.

Contexte scientifique

Le dispositif français d'établissement des VLEP comporte trois phases clairement distinctes :

- une phase d'expertise scientifique indépendante (seule phase confiée à l'Anses) ;
- une phase d'établissement d'un projet réglementaire de valeur limite contraignante ou indicative par le ministère chargé du travail ;
- une phase de concertation sociale lors de la présentation du projet réglementaire au sein du Conseil d'Orientation sur les Conditions de Travail (COCT). L'objectif de cette phase est de discuter de l'effectivité des valeurs limites et de déterminer d'éventuels délais d'application, en fonction des problèmes de faisabilité technico-économique.

L'organisation de la phase d'expertise scientifique nécessaire à la fixation des valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP) a été confiée à l'Afsset dans le cadre du plan santé au travail 2005-2009 (PST), puis à l'Anses suite à la fusion de l'Afsset et de l'Afssa en 2010.

Les VLEP telles que recommandées par le CES « expertise en vue de la fixation de valeurs limites à des agents chimiques en milieu professionnel », sont des niveaux de concentration en polluants dans l'atmosphère des lieux de travail à ne pas dépasser sur une période de référence déterminée

⁴Complétant et modifiant la circulaire du 19 juillet 1982 relative aux valeurs admises pour les concentrations de certaines substances dangereuses dans l'atmosphère des lieux de travail.

et en deçà desquels le risque d'altération de la santé est négligeable. Même si des modifications physiologiques réversibles sont parfois tolérées, aucune atteinte organique ou fonctionnelle de caractère irréversible ou prolongée n'est admise à ce niveau d'exposition pour la grande majorité des travailleurs. Ces niveaux de concentration sont déterminés en considérant que la population exposée (les travailleurs) est une population qui ne comprend ni enfants ni personnes âgées.

Ces niveaux de concentrations sont déterminés par les experts du CES VLEP à partir des informations disponibles dans des études épidémiologiques, cliniques ou de toxicologie animale. L'identification de ces concentrations sécuritaires pour la santé humaine nécessite généralement d'appliquer des facteurs de correction aux valeurs identifiées directement par les études. Ces facteurs permettent de prendre en compte un certain nombre d'éléments d'incertitude inhérents à la démarche d'extrapolation conduite dans le cadre d'une évaluation des effets sanitaires des substances chimiques sur l'Homme.

Trois types de valeurs peuvent être recommandées par le CES :

- Valeur limite d'exposition 8 heures : il s'agit de la limite de la moyenne pondérée en fonction du temps de la concentration atmosphérique d'un agent chimique dans la zone de respiration d'un travailleur au cours d'un poste de 8 heures. Dans l'état actuel des connaissances scientifiques (en toxicologie, médecine, épidémiologie), la VLEP-8h est censée protégée d'effets sur la santé à moyen et long termes, les travailleurs exposés régulièrement et pendant la durée d'une vie de travail à l'agent chimique considéré ;
- Valeur limite d'exposition à court terme (VLCT) : il s'agit de la limite de la moyenne pondérée en fonction du temps de la concentration atmosphérique d'un agent chimique dans la zone de respiration d'un travailleur sur une période de référence de 15 minutes pendant le pic d'exposition quelle que soit sa durée. Elle vise à protéger les travailleurs des effets néfastes sur la santé (effets toxiques immédiats ou à court terme, tels que des phénomènes d'irritation), dus à des pics d'exposition ;

Valeur plafond : il s'agit de la limite de la concentration atmosphérique d'un agent chimique dans la zone de respiration d'un travailleur, qui ne doit être dépassée à aucun moment de la période de travail. Cette valeur est appliquée aux substances reconnues comme irritant fort ou corrosif ou pouvant causer un effet grave potentiellement irréversible, à très court terme. Ces trois types de valeurs sont exprimés :

- soit en mg.m^{-3} , c'est-à-dire en milligrammes d'agent chimique par mètre cube d'air et en ppm (parties par million), c'est-à-dire en centimètres cube d'agent chimique par mètre cube d'air, pour les gaz et les vapeurs ;
- soit en mg.m^{-3} , uniquement pour les aérosols liquides et solides ;
- soit en f.cm^{-3} , c'est-à-dire en fibres par cm^3 pour les matériaux fibreux.

La valeur de la VLEP-8h peut être dépassée sur de courtes périodes pendant la journée de travail à condition toutefois :

- que la moyenne pondérée des valeurs sur l'ensemble de la journée de travail ne soit pas dépassée ;
- de ne pas dépasser la valeur de la VLCT si elle existe.

En plus des VLEP, le CES évalue la nécessité d'attribuer ou non une mention « peau », lorsqu'une pénétration cutanée significative a été identifiée (Anses, 2014). Cette mention indique la nécessité de prendre en compte la voie d'exposition cutanée dans l'évaluation de l'exposition et, le cas échéant, de mettre en œuvre des mesures de prévention appropriées (telles que le port de gants de protection). En effet, la pénétration cutanée des substances n'est pas prise en compte pour la détermination des niveaux de valeurs limites atmosphériques et peut donc potentiellement entraîner des effets sanitaires indépendamment du respect de ces dernières.

Le CES évalue également la nécessité d'attribuer ou non une mention « ototoxique » signalant un risque d'atteinte auditive en cas de co-exposition au bruit et à la substance en dessous des limites d'exposition recommandées afin que les préventeurs mettent en place des mesures appropriées (collective, individuelle et médicale) (Anses, 2014).

Le CES évalue également les méthodes de référence applicables pour la mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail. La qualité de ces méthodes et leur applicabilité à la mesure des expositions aux fins de comparaison à une VLEP ont été évaluées notamment sur leur conformité aux exigences de performance de la NF-EN 482 et de leur niveau de validation.

Organisation de l'expertise

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisé (CES) « expertise en vue de la fixation de valeurs limites à des agents chimiques en milieu professionnel » (CES « VLEP ») l'instruction de cette saisine. L'Agence a également mandaté :

- le groupe de travail « effets sanitaires » pour la réalisation des travaux d'expertise relatifs aux effets sanitaires ;
- le groupe de travail « métrologie » pour l'évaluation des méthodes de mesures atmosphériques dans les lieux de travail.

Plusieurs agents de l'Anses ont contribué à ces travaux et se sont chargés de la coordination scientifique des différents groupes d'experts.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été soumis régulièrement au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Le rapport final tient compte de l'ensemble des observations.

Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise ».

Prévention des risques de conflits d'intérêts

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).

Description de la méthode

Pour l'évaluation des effets sur la santé

Un rapport de synthèse a été élaboré par le GT « effets sanitaires » et soumis au CES VLEP qui l'a commenté et complété.

Les données et informations de ce rapport sont issues principalement du « Risk Assessment Report » de la Commission Européenne publié en 2003 et du rapport d'expertise collective de l'Inserm intitulé « Reproduction et Environnement » publié en 2011. Elles ont été complétées par une revue de la littérature sur Medline et Toxline principalement entre décembre 2010 (date de fin de la bibliographie du rapport de l'Inserm) et janvier 2012.

Pour l'évaluation des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail

Un rapport de synthèse a été élaboré par le GT « métrologie » et soumis au CES VLEP qui l'a commenté.

Le rapport de synthèse présente les différents protocoles de mesure du di-n-butyl-phtalate dans l'air des lieux de travail recensés et regroupés en fonction des méthodes mises en œuvre. Ces dernières ont ensuite été évaluées et classées au regard des exigences de performances indiquées notamment dans la norme NF EN 482 : « Atmosphère des lieux de travail – Exigences générales concernant les performances des modes opératoires de mesurage des agents chimiques » et des critères de décision détaillés dans le rapport méthodologie.

La liste des principales sources consultées est précisée dans le rapport méthodologie.

Le classement de ces méthodes est réalisé selon la manière suivante :

- Catégorie 1A : la méthode est reconnue et validée (l'ensemble des critères de performance de la norme NF-EN 482 sont satisfaits) ;
- Catégorie 1B : la méthode est partiellement validée (les critères essentiels de performance de la norme NF EN 482 sont satisfaits) ;
- Catégorie 2 : la méthode est indicative (des critères essentiels de validation ne sont pas suffisamment explicités) ;
- Catégorie 3 : la méthode n'est pas recommandée (des critères essentiels de validation sont absents ou inappropriés)

Une étude comparative et détaillée des méthodes classées en catégorie 1A, 1B et 2 est réalisée au regard des différentes données de validation et de la faisabilité technique, de manière à recommander la ou les méthodes les plus appropriées pour la mesure des concentrations aux fins de comparaison aux VLEP.

Le rapport ainsi que la synthèse et les conclusions de l'expertise collective ont été adoptées par le CES « Expertise en vue de la fixation de valeurs limites à des agents chimiques en milieu professionnel » (mandature 2010-2013) le 10 octobre 2013.

Ce rapport et les conclusions ont fait l'objet d'une consultation publique du 27/08/2014 au 28/10/2014. Aucun commentaire n'a été reçu lors de la consultation. Le CES VLEP (mandature 2014 - 2017) a adopté cette version finalisée le 14 décembre 2015.

Résultat de l'expertise collective concernant les effets sanitaire du di-n-butyl-phtalate

Le di-n-butyl-phtalate (DnBP) est un phtalate utilisé comme plastifiant de produits très courants. Les phtalates sont utilisés dans la plupart des articles rigides, semi-rigides ou souples à base de chlorure de polyvinyle (PVC). La proportion peut atteindre 50 % de phtalates dans certains produits, comme les sacs en plastiques, les cadres pour fenêtres, les emballages alimentaires, les imperméables en plastique, les rideaux de douche, les bottes, les tuyaux d'arrosage, certains dispositifs médicaux et les contenants pour le stockage du sang.

Cinétique et métabolisme

Les données concernant la toxicocinétique du DnBP chez l'Homme sont très limitées, et plus particulièrement après une exposition par inhalation (pour laquelle les données disponibles chez l'animal sont également peu nombreuses).

Aucune donnée relative à l'absorption du DnBP par inhalation n'a été identifiée dans la littérature. La voie cutanée ne semble pas être une voie majoritaire pour l'absorption de cette substance (flux

de perméation de $0,07 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$). Chez les rongeurs, l'absorption gastro-intestinale est proche de 100%.

La distribution est rapide dans l'organisme et dépend de la voie d'exposition. Dans une étude exposant des rats par inhalation à des concentrations de $0,5$ et $50 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$, 6 heures par jour pendant 3 ou 6 mois, les organes cibles identifiés sont le cerveau, les poumons, le foie, les reins et les testicules (Kawano, 1980). Après une exposition par voie orale de rats, aucune accumulation significative n'a été observée (William et Blanchfield, 1975 ; Tanaka *et al.*, 1978). Par ailleurs, le DnBP et ses métabolites sont capables de traverser la barrière placentaire chez le rat.

Chez le rat, par voie orale, le DnBP est hydrolysé en Mono-n-butyl phtalate (MnBP) soit au niveau de la muqueuse intestinale avant d'être absorbé par le tractus gastro-intestinal, soit, après absorption, par une lipase pancréatique. Le MnBP peut ensuite subir une oxydation de sa chaîne latérale. Les métabolites urinaires sont principalement le dérivé glucuroconjugué du MnBP et le MnBP libre (environ 66-70 % des métabolites) et les dérivés oxydés du MnBP. L'acide phtalique libre peut également être formé mais dans une moindre mesure. Chez l'Homme, des proportions similaires de MnBP total (libre et conjugué) dans les urines de 24 heures ont été retrouvées chez des volontaires exposés par voie orale (environ 64 à 73 % des métabolites).

Les métabolites des phtalates sont rapidement éliminés au niveau urinaire ; leur demi-vie est comprise entre 8 et 48 heures selon le phtalate. Le MnBP est le principal métabolite du DnBP identifié dans l'urine de rat et chez l'Homme. Il constitue un bon indicateur d'exposition chez les personnes professionnellement exposées au DnBP.

Chez le rat, le DnBP subit un cycle entérohépatique puisque plus d'un tiers de la dose absorbée est excrété par la bile pour être réabsorbé au niveau intestinal, ce qui explique la faible excrétion fécale (< 10%).

Toxicité générale

Toxicité chez l'Homme

Toxicité aiguë

Aucune donnée relative à la toxicité aiguë du DnBP par inhalation n'a été identifiée dans la littérature, sans doute en raison de la faible volatilité du DnBP.

Toxicité chronique

Deux études en milieu professionnel rapportent des perturbations neurologiques chez des travailleurs exposés chroniquement au DnBP par voie respiratoire. Toutefois, la présence de nombreux biais méthodologiques restreint fortement l'utilisation de ces résultats pour l'évaluation des risques sanitaires liés à la substance.

Toxicité sur la reproduction

Plusieurs études ont recherché les relations entre une exposition aux phtalates et des anomalies de l'appareil reproducteur (indicateurs : paramètres spermatiques, puberté précoce, endométriose, hormones etc.) chez l'homme adulte. Dans la plupart des études, les auteurs ne s'intéressent pas à un phtalate en particulier mais à plusieurs phtalates et à leurs métabolites (Inserm, 2011).

La majorité des études chez l'homme adulte retrouvent un lien entre les concentrations de phtalates urinaires (ou de leurs métabolites) et une altération des paramètres du sperme, dont la concentration et la morphologie des spermatozoïdes ainsi qu'une augmentation de la

fragmentation de l'ADN du gamète mâle. Cependant, quelques études ne mettent pas en évidence d'effets des phtalates sur les paramètres du sperme. Par ailleurs, une étude de type exposé/non exposé met en évidence une relation entre des concentrations élevées de MnBP et des concentrations basses de testostérone (Pan *et al.*, 2006 ; Inserm, 2011). Aucune de ces études n'est ni réellement spécifique du DnBP, ni capable d'identifier une relation dose/réponse reliant une exposition au DnBP et une altération de la qualité du sperme. De ce fait, aucune de ces études ne peut être utilisée pour la construction de la VLEP du DnBP.

Peu d'études ont évalué le rôle possible de l'exposition aux phtalates en lien avec la toxicité sur la reproduction chez les femmes. Les preuves apportées de l'existence possible d'un lien entre phtalates et endométriose par quelques études sont insuffisantes. Les effets de l'exposition aux phtalates sur la fonction ovulatoire et certains niveaux hormonaux (oestradiol, progestérone, LH, FSH) suggérés dans les études animales ne sont pas relatés chez la femme (Inserm, 2011). Un effet spécifique du DnBP n'a pu être retrouvé.

Plusieurs études ont investigué les effets d'une exposition aux phtalates dont le DnBP sur le développement *in utero*. Les résultats des publications de Swan (2005 et 2008) montrent une diminution de la distance anogénitale chez les nouveau-nés garçons, ce qui suggère une action des phtalates sur l'androgénisation du fœtus. D'autres études sur des effectifs plus larges sont nécessaires pour confirmer ces premiers résultats (Inserm, 2011). Ces études ne pourront pas être utilisées pour la construction d'une VLEP en raison de l'absence de mesure de concentrations atmosphériques de DnBP.

Effets cancérogènes - génotoxicité

Il n'existe pas d'étude publiée permettant d'appréhender la cancérogénicité du DnBP chez l'Homme.

Toxicité chez l'animal

Les données issues de l'expérimentation animale sont beaucoup plus fournies que celles chez l'Homme. Cependant il est important de noter que la voie d'exposition la plus fréquemment considérée reste la voie orale. En raison du nombre important d'études, le lecteur est invité à revenir au rapport d'expertise collective pour leur description détaillée.

Toxicité aiguë

Par inhalation, la CL₅₀ chez le rat est supérieure à 15,68 mg.L⁻¹ après 4 heures d'exposition et égale à 25 mg.L⁻¹ chez la souris après 2 h d'exposition (Voronin, 1975 ; Greenough et al. 1981 cités par CE, 2003).

Toxicité subchronique et chronique

Des effets locaux respiratoires (lésions non inflammatoires des voies aériennes supérieures) ont été mis en évidence dès 1,18 mg.m⁻³ chez des rats exposés « nose-only » dans l'étude de Gamer *et al.*, 2000 (étude non publiée citée par l'ECHA, 2012a).

Par voie orale, la toxicité subchronique du DnBP chez les rongeurs a fait l'objet de 10 publications dont 2 chez la souris et 8 chez le rat. Plusieurs de ces études rapportent des modifications des paramètres hématologiques (diminution de l'hématocrite et du nombre d'érythrocytes) et biologiques (augmentation des taux sériques d'albumine et de glucose, diminution des triglycérides) ainsi qu'une augmentation du poids de certains organes (foie, rein). Une augmentation de marqueurs de la prolifération peroxysomale hépatique a également été notée dans certaines études. L'existence d'une relation entre la prolifération des peroxysomes et la survenue de tumeurs hépatiques a été suggérée chez les rongeurs (Lapinskas, 2005). Plusieurs

études ont cependant montré qu'il s'agissait d'une spécificité d'espèce. Par conséquent ces effets sont considérés comme non transposables à l'Homme.

Toxicité sur la reproduction

Effets sur la fertilité et les organes de la reproduction

Plusieurs types d'effets sont observés chez le mâle adulte après une exposition au DnBP : des effets testiculaires à la fois structuraux et fonctionnels, ainsi qu'une diminution de la fertilité mâle consécutive probablement à ces effets. Parmi les effets décrits figurent, entre autres, une diminution du poids des testicules, des glandes sexuelles accessoires, une dégénérescence des tubes séminifères, une diminution du taux de zinc et de fer testiculaire, une diminution du taux de testostérone sanguine mais une augmentation du taux de testostérone testiculaire, une hyperplasie des cellules interstitielles, une diminution du nombre de spermatozoïdes, un décollement des cellules germinales, une diminution de l'activité enzymatique (succinate déshydrogénase) des cellules de Sertoli.

Il semble que le testicule adulte de rat ou de lapin soit beaucoup moins sensible aux effets d'une exposition aux phtalates que le testicule fœtal ou postnatal (Inserm, 2011).

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

Effets sur le développement

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

Le DnBP administré aux rates gestantes inhibe l'activité stéroïdogène du testicule fœtal dans diverses souches de rats. Les conséquences d'une inhibition de la synthèse de testostérone fœtale ont été clairement identifiées. Ainsi différents défauts de masculinisation sont décrits : une diminution de la distance anogénitale, la rétention d'aréoles mammaires ou de mamelons chez le mâle, la diminution de la longueur du pénis, une baisse du poids de la prostate, une augmentation des hypospadias et du taux de cryptorchidies (Inserm, 2011).

Des effets embryotoxiques et tératogènes ont été observés chez l'animal. Les effets les plus sensibles sont observés sur le développement de l'appareil reproducteur mâle en lien avec une activité anti-androgénique du DnBP. Les plus faibles doses associées à un effet ont été observées chez des rats. Un NOAEL de $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ basée sur une diminution de la concentration de testostérone testiculaire (observée à 50 mg/kg/j) peut être déduite après une exposition *in utero*.

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

Effets cancérigènes – génotoxicité

Il n'existe pas d'étude pertinente à long terme de cancérogenèse disponible chez les animaux de laboratoire. Plusieurs phtalates dont le DnBP sont connus pour induire une prolifération des péroxysomes au niveau hépatique chez le rat et la souris, qui se traduit par des modifications structurales après observation au microscope électronique et des changements dans les activités enzymatiques associées aux péroxysomes. Il a été suggéré une relation entre la prolifération des

péroxyosomes et la survenue de tumeurs hépatiques chez les rongeurs (Lapinskas, 2005). Ces effets cancérogènes observés chez les rongeurs sont considérés non transposables à l'Homme.

Sur la base des résultats des nombreuses études relatives à la génotoxicité du DnBP, ce dernier est considéré comme non génotoxique (CE, 2003).

Construction des VLEP

Valeur limite d'exposition professionnelle sur 8h

Choix de l'effet critique

Faute de données disponibles chez l'Homme pouvant être utilisées dans le cadre de la construction d'une VLEP pour le DnBP, il paraît pertinent d'employer les données relatives à l'espèce animale la plus sensible, à savoir le rat mâle, durant la période qui paraît la plus sensible, l'exposition *in utero*. Les effets sur le développement de l'appareil reproducteur mâle en lien avec une activité anti-androgénique du DnBP interviennent à la fois au niveau histologique et fonctionnel.

D'après les données de la littérature, la différenciation des testicules a lieu au 14,5^{ème} jour de gestation chez le rat et au 43^{ème} jour chez l'Homme (Shepard, 1998). Or, pendant le premier tiers de la grossesse, la femme enceinte est susceptible d'être exposée professionnellement au DnBP. On peut estimer qu'une bonne cohérence existe pour les effets reprotoxiques tant chez l'animal que chez l'Homme. Par conséquent les effets toxiques sur la reproduction du DnBP semblent donc les plus pertinents à considérer pour la construction d'une VLEP.

Choix de l'étude clé et identification de la dose repère

Parmi les études expérimentales chez l'animal sur les effets toxiques sur la reproduction du DnBP, l'étude de Lehmann (2004) exposant des rats par voie orale entre le 12^{ème} et le 19^{ème} jour de gestation est celle objectivant le NOAEL le plus bas et présente l'effet le plus sensible. Par conséquent cette étude est retenue pour la construction de la VLEP.

L'effet critique retenu parmi l'ensemble des effets sur l'appareil reproducteur mâle attendus à partir de cette étude est la diminution de la concentration de testostérone testiculaire chez le fœtus. Le NOAEL identifié est de 10 mg.kg⁻¹.j⁻¹.

Extrapolation voie à voie

Chez les rongeurs, l'absorption gastro-intestinale du DnBP est proche de 100% (Inserm, 2011). En l'absence de donnée, il est considéré par défaut que l'absorption par inhalation chez le rongeur est de 100%. En l'absence d'autres données, le CES considère par défaut que ces pourcentages d'absorption sont les mêmes chez l'Homme.

Selon ECHA (2012b), le volume respiratoire d'un rat pour une exposition de 8h (exprimé par kilogramme de poids corporel) est de 0,38 m³.kg⁻¹. Il correspond au volume respiratoire « standard » de 6,7 m³ chez un homme de 70 Kg. Pour rappel, le volume respiratoire d'un travailleur est estimé à 10 m³.

On obtient :

$$NOAEL_{\text{inhalé}} \text{ estimé (mg.m}^{-3}\text{)} = NOAEL_{\text{voie orale rat}} \times \frac{1}{0,38} \times \frac{6,7}{10}$$

L'application de ce calcul aux données issues de l'étude de Lehmann (2004) conduit à un NOAEL équivalent, chez le travailleur, par inhalation de 17,6 mg.m⁻³.

Choix des facteurs d'ajustement (FA)

Il est proposé d'appliquer les facteurs d'ajustement suivants :

- variabilité inter-espèce (FA_A) : 3 justifié par l'ajustement allométrique qui permet de s'affranchir de la composante cinétique. L'Inserm sur la base d'une revue complète de la littérature conclut que l'on ne dispose pas de données suffisantes pour affirmer que l'Homme est plus sensible que le rat ou l'inverse. Les études sur primates non humains ne sont pas suffisantes pour juger de la pertinence du modèle animal et les effets observés chez les rongeurs sont à prendre en compte.
- variabilité inter-individuelle (FA_H) : 3. En l'absence de données quantifiée sur la variabilité inter-individuelle, la valeur de 3 est attribuée par défaut à ce facteur.

Bien que la voie d'exposition ne soit pas la plus adaptée pour la construction de VLEP, l'application d'un facteur d'ajustement pour l'extrapolation voie à voie n'est pas nécessaire. En effet :

- s'agissant d'un effet systémique, les calculs ont été effectués selon un scénario qui considère que l'absorption par voie orale aussi bien que par inhalation est égale à 100% ;
- le NOAEL a été recalculé pour être adapté au volume pulmonaire du rat et sur la durée de travail du travailleur.

Effet critique	Dose critique	FS	VLEP-8h
Diminution de la concentration de testostérone fœtale (Lehman et al., 2004)	NOAEL = 10 mg.kg⁻¹.j⁻¹ <u>Ajustement allométrique :</u> <u>Extrapolation voie à voie</u> NOAEL_{HEC}inhalé = 17,6 mg. m⁻³	9 FS _A 3 FS _H 3	1,95 mg.m³ arrondi pour recommander une VLEP-8h de 2 mg.m⁻³

Valeur limite court terme sur 15 minutes

Chez l'Homme, aucune donnée sur l'irritation induite après une exposition au DnBP n'a été recensée dans la littérature. Chez l'animal et par inhalation, l'étude de Gamer *et al.*, 2000, (cité par CE, 2003 et ECHA, 2012a) décrit des effets locaux respiratoires sans que ne leurs soient associés une inflammation. De ce fait le RAR⁵ considère que l'irritation n'est pas transposable au travailleur.

Cependant, compte tenu du caractère reprotoxique de cette substance, une attention particulière devrait être accordée aux femmes en âge de procréer, afin d'éviter des pics d'exposition lors de fenêtres particulières. Dans ces conditions et conformément à sa méthodologie, le CES recommande de ne pas dépasser sur 15 minutes la valeur de 5 fois la VLEP-8h lors de toute exposition professionnelle au DnBP soit 10 mg.m⁻³.

Mention peau

L'étude in vitro de Scott *et al.*, 1987 rapporte une valeur du flux de perméation cutanée de 0,07 µg.cm⁻².h⁻¹ déterminé après application de DnBP non dilué sur de la peau humaine.

Conformément au document méthodologique du CES, l'application des critères ECETOC⁶ pour déterminer un apport relatif par la voie cutanée par rapport à l'inhalation, à un niveau d'exposition

⁵ Risk Assesment Report

⁶ La quantité de composé absorbé après exposition des mains et des avant-bras (2000 cm²) pendant 1h doit contribuer à plus de 10 % de la dose systémique absorbée par inhalation sur 1 journée de travail de 8h à la VLEP-8h (ECETOC, 1993).

correspondant à la VLEP-8H (2 mg.m⁻³) donne une contribution de 0,7%. Par conséquent, le CES ne recommande pas l'attribution de la mention peau pour cette substance.

Conclusions

VLEP-8h recommandée : 2 mg.m⁻³ ;

Pas de VLCT-15min proposée ;

Mais il est par ailleurs recommandé de ne pas dépasser sur 15 minutes une VLCT-15min pragmatique de 10 mg.m⁻³ correspondant à 5 fois la VLEP-8h recommandée ;

Pas d'attribution de la Mention « peau ».

Résultat de l'expertise collective concernant les méthodes de mesure atmosphériques dans les lieux de travail

Évaluation des méthodes de mesure du di-n-butyl-phtalate dans l'air des lieux de travail.

Le tableau suivant présente les cinq méthodes de mesure recensées et évaluées.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des méthodes de mesurage du DnBP dans l'air des lieux de travail

N°	Méthodes	Protocoles
1	Prélèvement sur tube de mousse polyuréthane - Désorption dans du toluène - Analyse par chromatographie en phase gazeuse (détecteur FID ou CE)	MétroPol : fiche 96 : 2006
2	Prélèvement sur tube OVS - Désorption dans du toluène - Analyse par chromatographie en phase gazeuse (détecteur FID)	OSHA 104 : 1994
3	Prélèvement sur membrane en ester de cellulose - Désorption dans CS ₂ - Analyse par chromatographie en phase gazeuse (détecteur FID)	NIOSH NMAM 5020, issue 2 : 1994
4	Prélèvement sur filtre nitrate de cellulose - Désorption dans un mélange eau/acétonitrile - Analyse par chromatographie en phase liquide (détecteur UV)	IRSST : méthode 308.-1
5	Prélèvement sur filtre en acétate de cellulose et tube de gel de silice - Désorption dans le méthanol - Analyse par chromatographie en phase liquide (détecteur UV)	DFG méthode 2 :2006 et IFA : méthode 8387 : 2009

Les deux graphiques ci-dessous présentent le domaine pour lesquelles les différentes méthodes ont été testées, ainsi que leur limite de quantification au regard de la VLEP-8h et de la VLCT-15 min pragmatique recommandées par le CES VLEP.

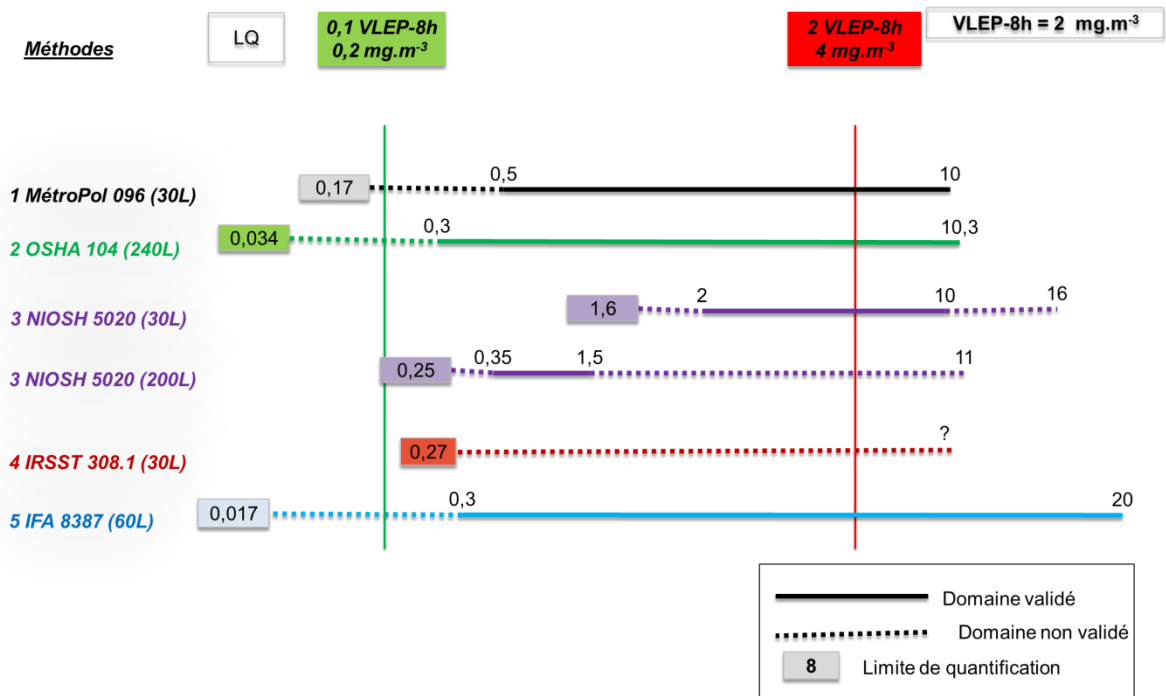


Figure 1 : Domaine de validité et limite de quantification des différentes méthodes comparés au domaine 0,1 à 2 VLEP-8h recommandée par le CES VLEP pour le DnBP

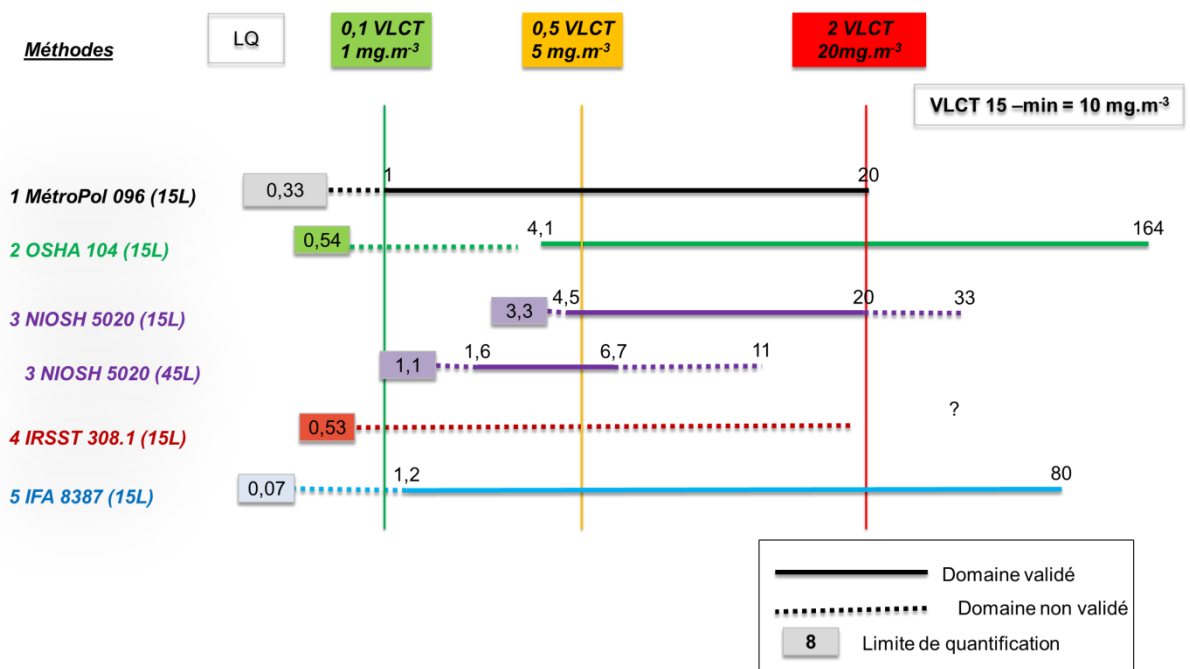


Figure 2 : Domaine de validité et limite de quantification des différentes méthodes comparés au domaine 0,1 à 2 VLCT-15min pragmatique recommandée par le CES VLEP pour le DnBP

Deux méthodes disposent des éléments de validation pour répondre aux exigences de la norme EN 482 et peuvent ainsi permettre de déterminer la concentration du di-n-butyl-phtalate aux fins de comparaison avec la VLEP-8h et la VLCT-15min pragmatique recommandées par le CES :

- **La méthode 2 décrite par le protocole OSHA 104** consistant à effectuer un prélèvement sur un tube OVS, composé d'un filtre en fibre de verre et de 2 zones de ténax (140/70 mg) puis à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (détecteur FID) après désorption des supports dans le toluène.
- **La méthode 5 décrite par le protocole DFG** (ou méthode IFA 8287) consistant à effectuer un prélèvement sur un ensemble constitué d'un filtre en acétate de cellulose (diamètre 37 mm) et d'un tube de gel de silice (type ORBO 502-Supelco) puis à l'analyse par chromatographie en phase liquide (détecteur DAD) après désorption des supports dans le méthanol.

Néanmoins, ces deux méthodes ne sont pas équivalentes.

Afin de choisir la méthode la plus appropriée, il convient au préalable de s'assurer si le composé est présent sous forme d'un aérosol, d'une phase gazeuse ou d'une phase mixte (aérosol + gaz) :

- Lorsqu'on est en présence d'une phase mixte du di-n-butyl-phtalate (aérosol + gaz) ou d'un aérosol seul de ce composé, l'ensemble du dispositif de prélèvement décrit dans le protocole DFG peut permettre, en mettant en œuvre une cassette fermée de 37 mm, en amont du tube de gel de silice, et au débit recommandé de $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, de s'assurer de la collecte de la fraction inhalable de l'aérosol, selon la norme EN 481.
- En revanche, dans ce cas, le protocole donné par l'OSHA ne pourrait pas convenir car la fraction de l'aérosol prélevée par le tube OVS n'est pas connue. Ainsi, le protocole de l'OSHA ne conviendrait que si l'on est sûr d'être en présence uniquement de la seule phase gazeuse du di-n-butyl-phtalate.

Par ailleurs, les critères de validation de ces méthodes ne permettent pas de les classer au même niveau quel que soit le type de VLEP à contrôler. Ainsi :

- Lorsque le di-n-butyl-phtalate est présent sous la seule forme gazeuse :
 - o La méthode 2 est partiellement validée pour le contrôle technique de la VLEP-8h recommandée par le CES VLEP, le contrôle technique de la VLCT-15min pragmatique recommandée par le CES VLEP et le suivi des expositions court terme.
- Lorsque le di-n-butyl-phtalate est présent sous forme d'une phase mixte ou d'un aérosol seul :
 - o Seule la méthode 5 permet de prélever la fraction inhalable. Elle est partiellement validée pour le contrôle technique de la VLCT-15min pragmatique recommandée par le CES VLEP, mais indicative pour le contrôle technique de la VLEP-8h recommandée par le CES VLEP du fait des données de validation obtenues par dopage et passage d'un flux d'air pendant 1h.

Lorsque le di-n-butyl-phtalate est présent sous forme d'un aérosol seul :

- o La méthode 3 décrite par le protocole NIOSH NMAM 5020 consistant à effectuer un prélèvement sur membrane en ester de cellulose puis une analyse par chromatographie en phase gazeuse (détecteur FID) après désorption dans CS₂, permet de prélever la fraction inhalable. Elle est partiellement validée pour le suivi des expositions court terme. Par contre, elle ne permet pas d'atteindre le dixième de la VLCT-15min pragmatique recommandée par le CES VLEP ni le dixième de la VLEP-8h. Elle n'est donc pas adaptée pour le contrôle technique de la VLCT-15min et de la VLEP-8h.

Les autres méthodes, à savoir la méthode MétroPol 96 de l'INRS et la méthode 308-1 de l'IRSST, sont classées en catégorie 3, du fait de l'insuffisance ou du caractère incomplet des données

publiées, rendant impossible de s'assurer du respect de l'ensemble des exigences de la norme EN 482.

Le groupe recommande donc les méthodes suivantes :

Méthode	Protocole	Catégorie		
		pour contrôle technique réglementaire de la VLEP-8h	pour contrôle technique réglementaire de la VLCT-15min ⁷	pour le suivi des expositions court terme
Méthode 2 : prélèvement actif sur tube OVS – désorption dans le toluène – analyse par GC/FID	OSHA 104 : 1994	1 B <u>Si présence uniquement phase gazeuse</u>		
Méthode 5 : prélèvement actif sur une membrane en acétate de cellulose suivie d'un tube de gel de silice – désorption méthanol – analyse par HPLC/UV	IFA 8387 : 2009 DFG méthode 2 : 2006	2	1 B	
		<u>Si présence d'une phase mixte (aérosol + gaz) ou aérosol</u>		
Méthode 3 : Prélèvement sur membrane en ester de cellulose - Désorption dans CS2 - Analyse par chromatographie en phase gazeuse (détecteur FID)	NIOSH NMAM 5020	<u>3</u>	<u>1B</u>	
		<u>Si présence phase aérosol uniquement</u>		

Conclusions et recommandations

Sur la base des données actuellement disponibles, le CES recommande de fixer une VLEP-8h de 2 mg.m⁻³. Cette recommandation vise à protéger des effets sur le développement foetal de l'appareil reproducteur mâle en lien avec une activité anti-androgénique du DnBP lors d'exposition in utero (atteintes testiculaires notamment). Par ailleurs cette valeur est également protectrice pour l'ensemble des autres effets sur la population générale des travailleurs.

⁷ Les critères de validation et de performance pour les méthodes destinées au suivi des VLCT sont définis par la norme NF EN 482 sur un intervalle de 0,5 à 2 fois la VLCT. La réglementation française impose, dans le cas de contrôle technique de la valeur limite, que la méthode de mesure permette de mesurer le dixième de la VLCT-15min (Arrêté du 15 décembre 2009 relatif aux contrôles techniques des valeurs limites d'exposition professionnelle sur les lieux de travail et aux conditions d'accréditation des organismes chargés des contrôles, publié au JO du 17 décembre 2009). De ce fait, lorsque la méthode ne permet pas de mesurer le dixième de la VLCT-15min, celle-ci ne peut pas être classée en catégorie 1A ni 1B à des fins de contrôle réglementaire de la VLCT-15min. Par contre, elle pourrait être classée en catégorie 1A ou 1B uniquement à des fins d'évaluation de l'exposition professionnelle.

Les données actuellement disponibles ne permettent pas la recommandation d'une VLCT-15 min pour le DnBP. Aussi conformément à sa méthodologie⁸, le CES recommande de ne pas dépasser 5 fois la valeur de la VLEP-8h (soit 10 mg.m⁻³) pendant 15 minutes ;

Le CES ne recommande pas de mention « peau ».

En ce qui concerne l'évaluation des méthodes de mesure du DnBP sur les lieux de travail, deux méthodes de mesure sont recommandées selon la forme physique sous laquelle se trouve le DnBP et selon le type de VLEP à contrôler :

- lorsque le DnBP est présent sous la seule forme gazeuse le CES recommande la méthode 2, partiellement validée pour le contrôle technique réglementaire de la VLEP-8h ;
- lorsque le DnBP est présent sous forme d'une phase mixte ou d'un aérosol seul, le CES recommande la méthode 5, qui est indicative pour le contrôle technique réglementaire de la VLEP-8h.

Par ailleurs, en ce qui concerne le suivi des recommandations de la valeur à ne pas dépasser sur 15 minutes pour limiter les pics d'exposition, il existe deux méthodes partiellement validées: la méthode 2 pour une exposition à la seule forme gazeuse et la méthode 5 recommandée en présence d'une phase mixte ou d'un aérosol. Il est à noter que la méthode 3 est partiellement validée pour le suivi des expositions court terme lorsque le DnBP est présent sous forme d'aérosol, mais n'est pas validée pour le contrôle technique réglementaire de cette valeur.

⁸ Pour plus de détails, se reporter au rapport d'expertise collective en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel » de décembre 2008, portant sur les recommandations relatives aux valeurs limites d'exposition professionnelle en vue de limiter l'importance et le nombre de pics d'exposition dans une journée de travail (partie1)

Sigles et abréviations

ACGIH : American Conference of Governmental Industrial Hygienists

ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry

AIHA : American Industrial Hygiene Association

CE : Commission Européenne

CES : Comité d'Experts Spécialisés

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CL₅₀ : Concentration létale 50

CLP : désigne le règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges

COCT : Conseil d'Orientation sur les Conditions de Travail (COCT)

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CSLEP : Comité Scientifique en matière de Limites d'Exposition Professionnelle à des agents chimiques ou SCOEL en anglais

DL₅₀ : Dose Létale 50

ECB: European Chemical Bureau

EINECS : European Inventory of Existing Commercial Substances (inventaire européen des substances chimiques commerciales existantes)

ELINCS : European List of Notified Substances (liste européenne des substances notifiées)

GC/FID : Chromatographie en Phase Gazeuse avec Détection par Ionisation de Flamme

GESTIS : GefahrStoffInformationsSystem (système d'information sur les substances dangereuses)

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography

HSE : Health and Safety Executive

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité (France)

IRSST : Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail

ISO : International Standard Organisation

LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level; dose minimale entraînant un effet néfaste observé

LOD : Limit Of Detection (limite de détection)

LOQ : Limit Of Quantification (limite de quantification)

MnBP : Mono-n-butyl phtalate

MDHS : Methods for the Determination of Hazardous Substances (méthodes définies par le HSE)

MEHP : Mono-EthylHexyl Phtalate

MEK : Méthyléthylcétone

mmHg : Millimètres de Mercure (unité)

NIOSH : National Institut for Occupational Safety and Health (USA)

NMAM : NIOSH Manual of Analytical Methods

NOAEL : No Observed Adverse Effect Level; dose maximale sans effet néfaste observe

NR : non renseigné

OSHA : Occupational Safety and Health Administration

OR : Odds Ratio

Pa : Pascal (unité)

PBPK : Physiologically Based Pharmacokinetic
PM : Poids Moléculaire
PC : poids corporel
PEL : Permissible Exposure Limits (valeurs définies par l'OSHA)
PM : Poids Moléculaire
PPAR : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*
ppm : parties par millions
PST : Plan Santé au Travail
RAR : Risk Assessment Report
REL : Recommended Exposure Limits (valeurs définies par le NIOSH)
SCOEL : Scientific Committee for Occupational Exposure Limits (ou CSLEP en français)
STEL : Short Term Exposure Limit (limite d'exposition court terme)
TWA : Time Weighted Average (moyenne pondérée dans le temps)
US EPA : United-States Environmental Protection Agency
UV : detection UltraViolet
VLCT : Valeur Limite Court Terme
VLEP : Valeur Limite d'Exposition Professionnelle
VME : Valeur Moyenne d'Exposition

Préambule

Le dispositif français d'établissement des VLEP comporte trois phases clairement distinctes :

- une phase d'expertise scientifique indépendante (seule phase confiée à l'agence) :
- une phase d'établissement d'un projet réglementaire de valeur limite contraignante ou indicative par le ministère chargé du travail ;
- une phase de concertation sociale lors de la présentation du projet réglementaire au sein du Conseil d'Orientation sur les Conditions de Travail (COCT). L'objectif de cette phase étant de discuter de l'effectivité des valeurs limites et de déterminer d'éventuels délais d'application, fonction de problèmes de faisabilité technico-économique.

L'organisation de la phase d'expertise scientifique nécessaire à la fixation des valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP) a été confiée à l'Afsset dans le cadre du plan santé au travail 2005-2009 (PST), puis à l'Anses suite à la fusion de l'Afsset et de l'Afssa en 2010.

Les VLEP telles que recommandées par le CES « expertise en vue de la fixation de valeurs limites à des agents chimiques en milieu professionnel », sont des niveaux de concentration en polluants dans l'atmosphère des lieux de travail à ne pas dépasser sur une période de référence déterminée et en deçà desquels le risque d'altération de la santé est négligeable. Même si des modifications physiologiques réversibles sont parfois tolérées, aucune atteinte organique ou fonctionnelle de caractère irréversible ou prolongée n'est admise à ce niveau d'exposition pour la grande majorité des travailleurs. Ces niveaux de concentration sont déterminés en considérant que la population exposée (les travailleurs) est une population qui ne comprend ni enfants ni personnes âgées.

Ces niveaux de concentrations sont déterminés par les experts du CES à partir des informations disponibles dans des études épidémiologiques, cliniques ou de toxicologie animale. L'identification de ces concentrations sécuritaires pour la santé humaine nécessitent généralement d'appliquer des facteurs de correction aux valeurs identifiées directement par les études. Ces facteurs permettent de prendre en compte un certain nombre d'éléments d'incertitude inhérents à la démarche d'extrapolation conduite dans le cadre d'une évaluation des effets sanitaires des substances chimiques sur l'Homme.

Trois types de valeurs sont recommandées par le CES :

- Valeur limite d'exposition 8 heures (VLEP-8h) : il s'agit de la limite de la moyenne pondérée en fonction du temps de la concentration atmosphérique d'un agent chimique dans la zone de respiration d'un travailleur au cours d'un poste de 8 heures. Dans l'état actuel des connaissances scientifiques (en toxicologie, médecine, épidémiologie), la VLEP-8h est censée protégée d'effets sur la santé à moyen et long termes, les travailleurs exposés régulièrement et pendant la durée d'une vie de travail à l'agent chimique considéré.
- Valeur limite d'exposition à court terme (VLCT) : il s'agit de la limite de la moyenne pondérée en fonction du temps de la concentration atmosphérique d'un agent chimique dans la zone de respiration d'un travailleurs sur une période de référence de 15 minutes pendant le pic d'exposition quelle que soit sa durée. Elle vise à protéger les travailleurs des effets néfastes sur la santé (effets toxiques immédiats ou à court terme, tels que des phénomènes d'irritation), dus à des pics d'exposition.
- Valeur plafond : il s'agit de la limite de la concentration atmosphérique d'un agent chimique dans la zone de respiration d'un travailleur, qui ne doit être dépassée à aucun moment de la période de travail. Cette valeur est appliquée aux substances reconnues comme irritant fort ou corrosif ou pouvant causer un effet grave potentiellement irréversible, à très court terme.

Ces trois types de valeurs sont exprimés :

- soit en mg/m^3 , c'est-à-dire en milligrammes d'agent chimique par mètre cube d'air et en ppm (parties par million), c'est-à-dire en centimètres cube d'agent chimique par mètre cube d'air, pour les gaz et les vapeurs ;
- soit en mg/m^3 uniquement, pour les aérosols liquides et solides ;
- soit en f/cm^3 , c'est-à-dire en fibres par cm^3 pour les matériaux fibreux.

La valeur de la VLEP-8h peut être dépassée sur de courtes périodes pendant la journée de travail à condition toutefois :

- que la moyenne pondérée des valeurs sur l'ensemble de la journée de travail ne soit pas dépassée ;
- de ne pas dépasser la valeur de la VLCT si elle existe.

En plus des VLEP, le CES évalue la nécessité d'attribuer ou non une mention « peau », lorsqu'une pénétration cutanée significative a été identifiée (Anses, 2014). Cette mention indique la nécessité de prendre en compte la voie d'exposition cutanée dans l'évaluation de l'exposition et, le cas échéant, de mettre en œuvre des mesures de prévention appropriées (telles que le port de gants de protection). La pénétration cutanée des substances n'est pas prise en compte pour la détermination des niveaux de valeurs limites atmosphériques et peut donc potentiellement entraîner des effets sanitaires indépendamment du respect de ces dernières.

Le CES évalue également la nécessité d'attribuer ou non une mention « ototoxicité » signalant un risque d'atteinte auditive en cas de co-exposition au bruit et à la substance en dessous des limites d'exposition recommandées afin que les préventeurs mettent en place des mesures appropriées (collective, individuelle et médicale) (Anses, 2014).

Le CES évalue également les méthodes de référence applicables pour la mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail. La qualité de ces méthodes et leur applicabilité à la mesure pour une comparaison à une VLEP (VLEP-8h ou VLCT) ont été évaluées notamment sur leur conformité aux exigences de performance de la NF-EN 482⁹ et de leur niveau de validation. Suite à cette évaluation, les méthodes peuvent être classées en différentes catégories :

- 1A : méthode permettant la mesure d'une VLEP contraignante ; la méthode est reconnue et validée (l'ensemble des critères de performance de la NF-EN 482 sont satisfaits) ;
- 1B : méthode permettant la mesure d'une VLEP contraignante sous conditions de préciser quelques points de la méthode (une grande majorité des critères de performance de la NF-EN 482 sont satisfaits) ;
- Catégorie 2 : méthode permettant la mesure d'une VLEP indicative ; il manque des données pour que la méthode puisse être validée ;
- Catégorie 3 : la méthode n'est pas recommandée et ne doit pas être utilisée à des fins de comparaison aux VLEP.

⁹ NF EN 482 – 2012 : Exposition sur les lieux de travail – Exigences générales concernant les performances des procédures de mesure des agents chimiques

Partie A – Rapport d'évaluation des effets sur la santé

1. Informations générales

Le DnBP est un phtalate utilisé comme plastifiant de produits très courants. Les phtalates sont utilisés dans la plupart des articles rigides, semi-rigides ou souples à base de chlorure de polyvinyle (PVC). La proportion peut atteindre 50 % de phtalates dans certains produits, comme les sacs en plastiques, les cadres pour fenêtres, les emballages alimentaires, les imperméables en plastique, les rideaux de douche, les bottes, les tuyaux d'arrosage, certains dispositifs médicaux et les contenants pour le stockage du sang (Saint-Laurent et Rhainds, 2004).

Les données et informations de ce rapport sont issues principalement des rapports suivants :

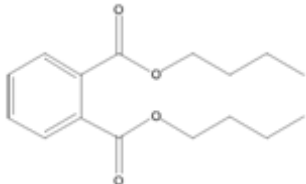
- rapport de l'ATSDR de 2001 intitulé « Toxicological Profile for Di-n-butyl phthalate » (ATSDR, 2001)
- « Risk Assessment Report » de l'European Bureau of Chemical (ECB) de la Commission Européenne de 2003
- la fiche toxicologique de l'INRS n° 98 (INRS, 2003)
- la fiche INRS-DEMETER intitulée Phtalate de dibutyle (INRS, 2006)
- rapport du prestataire réalisé à la demande de l'Agence et intitulé « Fiche de recueil des données – effets sur la santé : DBP » (A Cadène et V Nedellec, 2009)
- rapport de l'Afsset sur les Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR) fondées sur des effets reprotoxiques (Afsset, avril 2010)
- rapport d'expertise collective de l'Inserm « Reproduction et environnement » (Inserm, 2011)

Ils ont été complétés par une revue de la littérature sur Medline, Toxline principalement entre décembre 2010 (date de fin de la bibliographie de l'Inserm) et janvier 2012.

Dans l'ensemble de ce document le di-n-butyl-phtalate sera nommé DnBP.

Le DnBP peut être considéré comme un phatalate de longueur de chaîne principale intermédiaire (4 carbones).

1.1. Identification

Numéro CAS, EINECS, etc.	CAS : 84-74-2 EINECS : 201-557-4 INDEX : 607-318-004
Nom	Phtalate de dibutyle, Di-n-butyl-phtalate
Synonymes	Phtalate de di-n-butyle DnBP
Formule brute	C ₁₆ H ₂₂ O ₄
Formule développée	

1.2. Propriétés physico-chimiques

Forme physique	Liquide incolore, de consistance huileuse (INRS 2003), presque inodore
Poids moléculaire	278,35 g.mol ⁻¹ (NTP,2000)
Point d'ébullition	340°C (NTP,2000)
Point de fusion	-35 °C (NTP, 2000)
Tension de vapeur	4,67.10 ⁻³ Pa à 25 °C (INRS, 2003)
Densité	1,04 g.mL ⁻¹ (INRS, 2003)
Facteurs de conversion	1 ppm=11,38 mg/m ³ à 25°C et 101 kPa (INRS, 2003)
Solubilité	Faiblement soluble dans l'eau (11,2 mg/L) (NTP,2000)
LogKow	4,45 (NTP,2000)
LogKoc	3,14 (5,23) 1997
Point d'éclair	157°C (coupelle ouverte) (INRS, 2003)
Température d'auto-inflammation	400 à 403°C (INRS,2003)
Limites d'explosivité dans l'air	0,5% (limite inférieure) – 2,5% (limite supérieure) (INRS,2003)

1 ppm = 11,57 mg.m⁻³ à 20°C et 101,3 kPa

1.3. Classification et tableaux des maladies professionnelles

Classification européenne selon la directive 67/548/CEE	Toxique pour la reproduction, catégorie 2; R61 (risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant) Toxique pour la reproduction, catégorie 3; R62 (risque possible d'altération de la fertilité) Dangereux pour l'environnement, R50
Classification CIRC	Non classé
Tableau maladie professionnelle	Absent
Classement CLP	Toxique pour la reproduction catégorie 1B

2. VLEP existantes

2.1. Europe

2.1.1 France

Source/Date	Circulaire du ministère de Travail du 13 mai 1987 (non parue au J.O.)	
Contraignant/indicatif		
VME – 8h	mg.m ⁻³	5
	ppm	-
VLCT – 15 mn	mg.m ⁻³	NR
	ppm	NR
Mention peau	NR	

2.1.2 Allemagne

Source/Date	Gestis consulté en janvier 2012	
	mg.m ⁻³	0,58
Valeurs MAK (DFG, 2009)	TWA 8H	
	ppm	0,05
	STEL 15 min	
	mg.m ⁻³	1,16
	ppm	0,1
Valeurs réglementaires (AGS)	TWA 8H	
	mg.m ⁻³	0,58
	ppm	0,05
	STEL 15 min	
	mg.m ⁻³	1,16
	ppm	0,1
Mention peau	NR	

2.1.3 Danemark

Source/Date	Gestis consulté en janvier 2012	
TWA – 8h	mg.m ⁻³	3
	ppm	-

STEL	mg.m ⁻³	-
	ppm	-
Mention peau		NR

2.2. Etats-Unis

2.2.1 OSHA

Source/Date	Occupational Safety and Health Standards, Toxic and Hazardous Substances, dibutylphtalate	
PEL-TWA- 8h	mg.m ⁻³	5
	ppm	-
Mention peau		NR

2.2.2 ACGIH

Source/Date		
TLV – TWA (depuis 1968)	mg.m ⁻³	5
	ppm	-
Mention peau	NR	NR

2.2.3 NIOSH

Source/Date	National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) pocket guide to chemical hazards	
REL – TWA	mg.m ⁻³	5
	ppm	-
Mention peau		NR

3. Résumé de la synthèse du SCOEL

Aucun document produit par le SCOEL sur le DnBP n'est disponible lors de la rédaction de ce rapport.

4. Cinétique et métabolisme

Les données concernant la toxicocinétique du DnBP chez l'Homme sont très limitées, et plus particulièrement après une exposition par inhalation (pour laquelle il y a également peu de données chez l'animal).

4.1. Absorption

Le DnBP est absorbé par voie orale, par inhalation ou encore par voie cutanée.

4.1.1 Inhalation

Il n'existe pratiquement pas de données quantitatives sur l'absorption des phtalates par inhalation (seule une étude identifiée chez le rat indique qu'environ 1,5% d'une concentration de 100 mg de DEHP/m³, sous forme d'aérosol, est absorbé en 6 heures (Inserm, 2011 ; CE, 2003). Aucune étude n'a été retrouvée sur le DnBP.

4.1.2 Ingestion

Chez l'Homme, l'absorption orale de DnBP a été observée mais le taux de biodisponibilité n'est pas connu. Les prélèvements sanguins de 13 personnes ayant consommé des aliments emballés dans du plastique contenant du DnBP révèlent un taux plasmatique moyen de 0,10 mg. L⁻¹. Chez 9 personnes non exposées, le taux plasmatique moyen était de 0,02 mg/L (Tomita *et al.*, 1977 cité par CE, 2003).

Chez les rongeurs, l'absorption gastro-intestinale du DnBP est proche de 100% (Inserm, 2011). Après exposition orale, le DnBP est hydrolysé par des estérases au niveau du tissu intestinal pour former le dérivé majoritaire monoester « mono-n-butyl phtalate » ou MnBP, également rapidement et largement absorbé.

4.1.3 Contact cutané

Quelques travaux ont permis d'établir les niveaux d'absorption cutanée des principaux phtalates chez le rat (Elsisi *et al.*, 1989; McKee *et al.*, 2004). Concernant le DnBP, plus de 60% de la dose appliquée par voie cutanée est éliminée en 7 jours.

Après application cutanée d'une solution radiomarquée de DnBP dilué dans l'éthanol chez des rats mâles F344 à la dose de 44 mg/kg, 10-12% de la dose administrée ont été retrouvés dans les urines de 24 heures (1% dans les fèces). Après 7 jours, 60% de la dose étaient excrétés au niveau urinaire et 12% dans les fèces (Bronaugh, *et al.*, 1982 ; Elsis, *et al.*, 1989).

In vitro, l'absorption cutanée mesurée chez l'Homme (0,07 µg/cm²/h) est bien inférieure à celle mesurée chez le rat (9,33 µg/cm²/h) (Scott, *et al.*, 1987).

4.2. Distribution

La distribution est rapide dans l'organisme et dépend de la voie d'administration. Les études effectuées sur d'autres phtalates que le DEHP sont peu nombreuses et elles indiquent que la distribution se fait dans l'ensemble des tissus, sans véritable prééminence pour un organe particulier, ni rétention dans un tissu donné.

Après administration orale unique de DnBP radiomarqué chez des rats mâles Wistar, aucune accumulation significative n'a été observée (Williams et Blanchfield, 1975). Ces résultats sont confirmés par les travaux de Tanaka *et al.* (1978) chez le rat, qui observent, 24 heures après administration de 60 mg/kg de DnBP la distribution suivante : 0,06% de la dose administrée dans le foie, 0,02% dans les reins, 0,3% dans les muscles, 0,7% dans les tissus adipeux, 1,53% dans les intestins, 0,01% dans l'estomac et 0,02% dans le sang. Aucune trace de DnBP n'a été retrouvée dans les cerveau, cœur, poumons, rate, testicules, prostate, thymus.

Après exposition cutanée, la distribution du DnBP est différente puisque, après 7 jours, 0,41% d'une dose de 44 mg/kg à laquelle des rats F344 ont été exposés sont retrouvés au niveau du tissu adipeux, 1,4% au niveau de la peau et 1,1% au niveau musculaire. Trente % de la dose appliquée demeurent au niveau du site d'application (Elsisi *et al.*, 1989).

Après inhalation de DnBP chez le rat aux doses de 0,5 et 50 mg.m⁻³, 6 heures par jour durant 3 ou 6 mois, les organes cibles identifiés sont le cerveau, les poumons, le foie, les reins et les testicules (Kawano, 1980).

Le DnBP et ses métabolites peuvent traverser la barrière placentaire chez le rat Sprague-Dawley (Saillenfait, *et al.*, 1998). Après administration orale de DnBP radiomarqué aux doses de 500 et 1500 mg/kg à des femelles gestantes (gestational days, GD 14), les niveaux de radioactivité placentaires et embryonnaires mesurés correspondent au tiers ou moins du taux plasmatique retrouvé chez les mères (0,12-0,15% de la dose administrée).

4.3. Métabolisation

Aucune étude de biotransformation n'est actuellement disponible après administration par inhalation ou par voie percutanée.

Chez le rat, par voie orale, le DnBP est hydrolysé en MnBP soit au niveau de la muqueuse intestinale avant d'être absorbé par le tractus gastro-intestinal, soit, après absorption, par une lipase pancréatique (White *et al.*, 1980). Des études *in vitro* sur des préparations de foie (babouin, rat et furet), et de reins (rat) ont montré que cette hydrolyse peut aussi survenir au niveau hépatique ou rénal (Lake *et al.*, 1977; Rowland *et al.*, 1977, Tanaka *et al.*, 1978; White *et al.*, 1980).

Chez l'animal, le MnBP peut ensuite subir une oxydation de sa chaîne latérale. Les métabolites urinaires sont principalement le dérivé glucuroconjugué du MnBP et le MnBP libre (environ 66-70 % des métabolites) et les dérivés oxydés du MnBP. L'acide phtalique libre peut également être formé mais dans une moindre mesure (Figure 1).

Il existe des différences entre espèces concernant l'excrétion des métabolites conjugués ou non. Les ratios glucurono-conjugué du MnBP/MnBP libre retrouvés par Tanaka *et al.* (1978) sont respectivement de 1,0, 1,5 et 2,3 chez le rat, le cochon d'inde et le hamster. Foster *et al.*, quant à eux, rapportent que les glucurono conjugués retrouvés chez le rat et le hamster correspondent respectivement à 37,6 et 52,5% de la dose administrée (2 g/kg par voie orale), le MnBP libre s'élevant uniquement à 14,4 et 3,5% respectivement (Foster *et al.*, 1982).

Chez l'Homme, des proportions similaires de MnBP total (libre et conjugué) dans les urines de 24 heures ont été retrouvées chez des volontaires exposés par voie orale (environ 64-73 % des métabolites). Une étude a montré que le MnBP conjugué (essentiellement glucuroconjugué) représentait 94% du MnBP total urinaire chez l'Homme (Seckin *et al.*, 2009).

Une étude récente a montré la similarité des métabolites du DnBP chez le rat et chez l'Homme (Silva *et al.*, 2007). Le MnBP est le métabolite urinaire et sérique majoritaire dans les 2 espèces. Selon les auteurs, il constitue un bon indicateur d'exposition chez les personnes professionnellement exposées au DnBP. Deux autres métabolites sont significativement corrélés au MnBP : le mono-3-hydroxy-n-butyl-phtalate et le mono-3-carboxypropyl-phtalate. Dans la

plupart des cas cependant, les taux sériques sont trop faibles pour permettre une estimation correcte de l'exposition, expliquant la préférence pour les marqueurs urinaires.

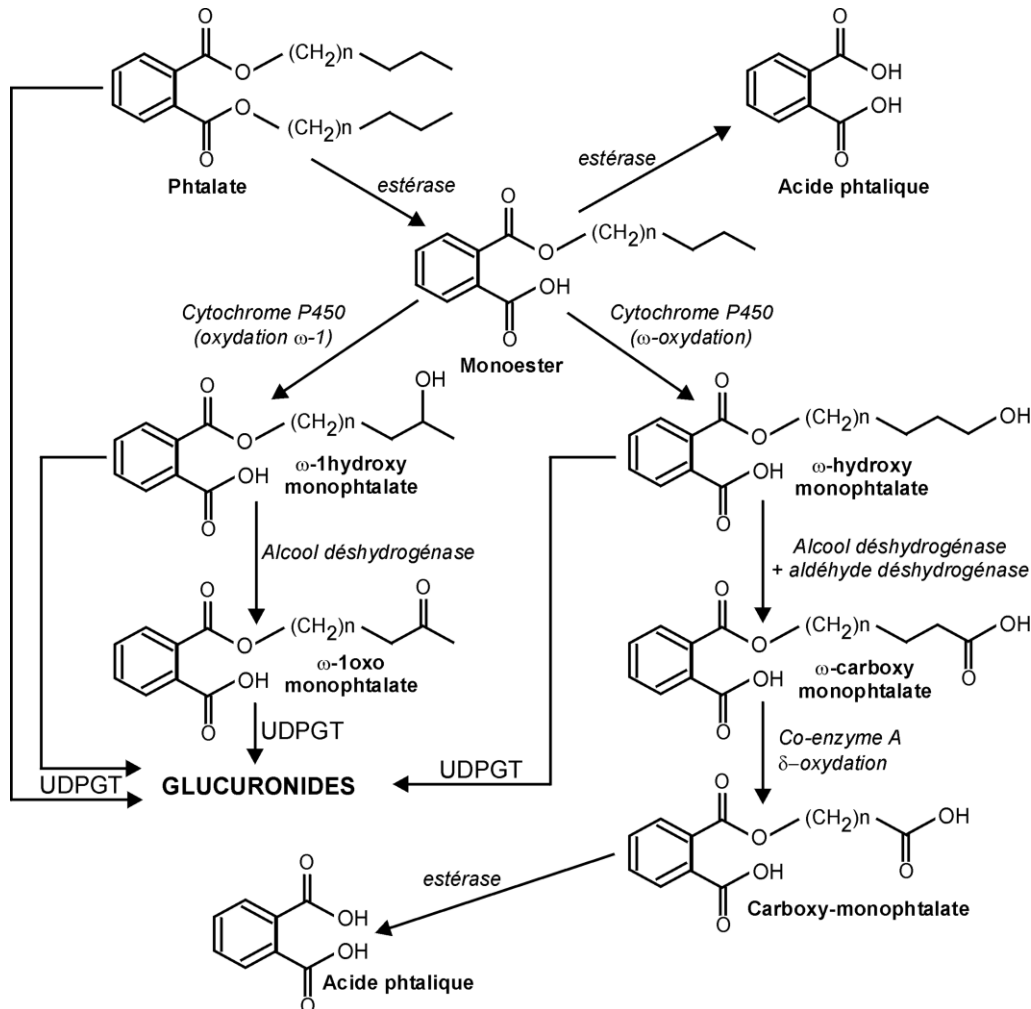


Figure 3 Principales voies métaboliques des phtalates chez les mammifères (INSERM, 2011)

UDPGT : Uridine 5'-diphosphoglucuronyl transférase

4.4. Excrétion

Les métabolites des phtalates sont rapidement éliminés au niveau urinaire ; leur demi-vie est comprise entre 8 et 48 heures selon le phtalate. Le MnBP est le principal métabolite du DnBP identifié dans l'urine de rat et chez l'Homme.

Dans les 48 heures consécutives à l'administration orale de DnBP radiomarqué chez le rat et le hamster, entre 63 et 90% de la dose sont retrouvés dans les urines (Foster *et al.*, 1982 ; Tanaka *et al.*, 1978 ; Williams et Blanchfield, 1975), la part contenue dans les fèces durant ce même temps représentant à peine 1,0 – 8,2% de cette dose. Le glucuronide du mono-*n*-butyl phtalate est le principal métabolite urinaire du DnBP. Le DnBP subit un cycle entérohépatique puisque plus d'un tiers de la dose absorbée est excrété par la bile pour être réabsorbé au niveau intestinal, ce qui explique la faible excrétion fécale (< 10%) (Tanaka *et al.*, 1978).

Dans la population générale, la concentration médiane de MnBP urinaire mesurée par Wittassek et Angerer (2007) sur un échantillon d'une centaine de personnes résidant dans le sud de l'Allemagne est de 50,4 µg/L.

Des modèles toxicocinétiques à base physiologique (PBPK) ont été développés pour les phtalates les plus étudiés : le DnBP et le DEHP. Récemment un modèle PBPK a été proposé pour

déterminer l'exposition des tissus cibles au DnBP et ses métabolites libres et conjugués chez des rates en gestation, prenant en compte l'exposition du fœtus (Clewell *et al.*, 2008). Ce modèle décrit la clairance urinaire, plasmatique, biliaire et fécale du DnBP, du MnBP, ainsi que des métabolites oxydés libres et conjugués après des administrations uniques (intraveineuse et orale) ou répétées (orale) de DnBP à des doses de 50, 100 ou 500 mg/kg de poids corporel. Le modèle permet de déterminer l'exposition fœtale au MnBP, le métabolite actif, à partir de données telles que la dose externe, les concentrations plasmatiques ou urinaires chez la mère, ou encore les teneurs mesurées dans le liquide amniotique. Ce modèle a également été extrapolé à l'Homme en ajustant les paramètres physiologiques et en utilisant des approches allométriques pour estimer les changements d'échelle concernant la distribution des xénobiotiques (Campbell *et al.*, 2008 cité par Inserm, 2011). Il permet, à partir des concentrations urinaires en MnBP de prédire l'exposition quotidienne en DnBP, ce qui suggère que le métabolisme du DnBP à faible dose chez le rat et chez l'Homme présente peu de différences (Inserm, 2011).

5. Toxicité générale

Dans la perspective de construction d'une VLEP pour le DnBP, il est important de souligner le fait que les données disponibles concernant les effets sur l'Homme et encore plus particulièrement après une exposition par inhalation sont très limitées.

5.1. Toxicité chez l'Homme

5.1.1 Toxicité aiguë

L'unique étude se rapportant à la toxicité aiguë du DnBP chez l'Homme concerne l'ingestion accidentelle du produit (10 g) par un homme de 23 ans (Cagianut, 1954 cité par CE, 2003). Les rapports établis alors mentionnent des symptômes généraux de toxicité (nausées, vomissements, étourdissements) suivis quelques heures après d'atteintes oculaires (larmoiement, photophobie et douleurs oculaires). La cornée s'est avérée fortement endommagée (kérato-conjonctivite) tandis que les analyses urinaires ont mis en évidence une atteinte urinaire (micro-hématurie, leucocyturie et albuminurie). Un rétablissement de ces troubles est obtenu en 14 jours à l'aide d'un traitement incluant antibiotiques et mydriatiques.

Il n'y a pas de données disponibles chez l'Homme par inhalation de DnBP sans doute en raison de la faible volatilité du DnBP.

5.1.2 Irritation

Il n'existe pas de données disponibles chez l'Homme.

5.1.3 Sensibilisation

Dans une étude finlandaise de Jaakkola *et al.* réalisée sur 2553 enfants âgés de 1 à 7 ans, les auteurs identifient l'apparition de pathologies telles que l'asthme, les rhinites allergiques, une toux persistante, etc. en relation avec l'exposition ou non à des matières plastiques présentes au domicile (Jaakkola *et al.*, 2000). Les auteurs montrent une augmentation de symptômes respiratoires en présence de revêtement de sol en PVC (sifflement persistant $OR_{ajusté} = 3,42$; $IC_{95\%} = 1,13-10,36$; toux $OR_{ajusté} = 2,41$; $IC_{95\%} = 1,04-5,63$; et crachats (flegme) $OR_{ajusté} = 2,76$; $IC_{95\%} = 1,03-7,41$) (Jaakkola, 2000). Par contre, le risque de survenue d'asthme est non significatif ($OR_{ajusté} = 1,52$; $IC_{95\%} = 0,35-6,71$). De même en cas de rhinite allergique ($OR_{ajusté} = 1,20$; $IC_{95\%} = 0,365-3,97$). L'ajustement portait sur le sexe, l'âge, le niveau d'éducation des parents, la présence d'un seul parent, le fait d'aller à la garderie, la présence d'animaux à fourrure ou à plume, le tabagisme passif et les problèmes d'humidité et de moisissures.

Une autre étude de Jaakkola *et al.* a été réalisée sur 5951 enfants russes âgés de 8 à 12 ans et est basée sur le même principe que la précédente (risque accru d'apparition de symptômes respiratoires en cas de présence de matériaux en PVC) (Jaakkola *et al.*, 2004). Les résultats montrent que les sifflements sont positivement et significativement associés aux revêtements de sols plastifiés et aux moquettes synthétiques ($OR_{ajusté}$ sol plastique = 1.36 [1.00-1.86], $OR_{ajusté}$ moquettes synthétiques = 1.70 [1.21-2.40]). L'ajustement a été fait sur l'âge, le sexe, la prénatalité, le poids de naissance, la présence d'une atopie chez les parents, le tabagisme maternelle durant la grossesse, le tabagisme passif et le niveau d'éducation des parents.

Une étude cas-témoins (521 cas pour 932 contrôles) de Jaakkola *et al.* met en évidence un lien entre des nouveaux cas d'asthme chez des adultes et la présence de revêtement mural en PVC au domicile ($OR_{ajusté} = 2.43$ avec $IC_{95\%} = 1.03-5.75$) (Jaakkola *et al.*, 2006). Cependant, dans cette étude, il n'est pas réalisé d'ajustement sur d'autres causes d'allergies que cela soit au domicile ou en milieu professionnel.

En 2008 une revue de la littérature effectuée par Jaakkola *et al.* montre une association entre l'exposition au PVC et l'apparition d'asthme, le méta risque d'asthme chez l'enfant est de OR = 1,55 ; IC_{95%} : 1,18-2,05 (Jaakkola et Knight, 2008).

Cependant toutes ces études ne permettent pas de conclure sur la responsabilité du DnBP puisqu'il se trouve, dans ces matériaux plastiques, en présence d'autres phtalates et d'autres composés. Il en est de même pour les poussières intérieures qui renferment d'autres composés susceptibles d'entraîner une sensibilisation des sujets (pollens, acariens, etc.) qui ne sont pas forcément pris en compte dans les analyses.

Il n'est pas possible d'attribuer spécifiquement au DnBP les effets observés dans les études, où les populations généralement étudiées sont, en outre, des enfants. Par conséquent, il n'apparaît pas pertinent de prendre l'asthme ou d'autres symptômes respiratoires comme effet critique pour l'établissement d'une valeur limite d'exposition professionnelle (conclusion confirmée par les données chez l'animal au paragraphe 5.2.3).

Plusieurs cas d'allergies cutanées ont été rapportés après utilisation de produits cosmétiques ou port d'un bracelet de montre au poignet ou d'un appareil auditif chez des patients chez qui des patch-tests montrent des résultats positifs avec le DnBP (Husain, 1975 ; Oliwiecki, 1991 ; Calnan, 1975 ; Sneddon, 1972). Toutefois dans le RAR, la CE considère que ces études ne permettent pas de conclure (études peu documentées).

5.1.4 Toxicité chronique

Deux études d'exposition professionnelle rapportent des perturbations neurologiques chez des travailleurs exposés chroniquement au DnBP par voie respiratoire. Malheureusement, la présence de nombreux biais méthodologiques restreint fortement l'utilisation de ces résultats pour l'évaluation des risques sanitaires liés à la substance.

Milkov *et al.* rapportent une prévalence élevée de polynévrites (47/147) chez des employés d'une installation de production de cuir artificiel, régulièrement exposés aux phtalates (principalement DnBP et phtalates plus lourds), ainsi qu'à de faibles concentrations en adipates et sebacates, les pathologies étant les plus fortes pour les sujets les plus exposés (Milkov *et al.*, 1973). Des pertes d'audition (diminution de l'excitabilité vestibulaire), des altérations des récepteurs olfactifs et cutanés sont observées pour 22 de ces sujets. Aucun groupe témoin n'a été constitué. Les niveaux d'exposition des travailleurs aux plastifiants se situaient entre 1,7 et 60 mg.m⁻³.

Une étude épidémiologique transversale menée chez des travailleurs issus de l'industrie de production de phtalates dont le DnBP, a révélé que sur les 23 individus exposés au DnBP, 12 d'entre eux présentaient des neuropathies. Les niveaux d'exposition moyens variaient entre 1 et 5 mg.m⁻³ avec des pics d'exposition évalués à 61 mg.m⁻³ (Gilioli *et al.*, 1978 cité par IPCS/WHO 1997).

Le DnBP est reconnu comme étant un perturbateur endocrinien (Bredhult *et al.*, 2007 ; Lu *et al.*, 2004). Les conséquences de cette propriété sont notamment perçues sur le plan de la reprotoxicité et concernent éventuellement la cancérogenèse. Ces effets seront donc discutés dans les chapitres correspondants.

5.1.5 Cancérogénicité

Il n'existe pas d'étude chez l'Homme publiée permettant d'appréhender le risque cancérogène du DnBP.

5.1.6 Toxicité sur la reproduction

Plusieurs études ont recherché les relations entre exposition aux phtalates et des anomalies de l'appareil reproducteur chez l'homme adulte. Le protocole de ces études était différent (études observationnelles, études cas-témoins, études exposés-non exposés) ainsi que les indicateurs étudiés (paramètres spermatiques, puberté précoce, endométriose, hormones...) (Inserm, 2011). Dans la plupart des études les auteurs ne s'intéressent pas à un phtalate en particulier mais à plusieurs phtalates et à leurs métabolites. Peu d'études concernent spécifiquement une exposition professionnelle. L'ensemble des études est analysé dans le rapport de l'Inserm (2011) ; seules celles pouvant avoir un intérêt pour l'élaboration de la VLEP du DnBP sont brièvement décrites ci-dessous.

5.1.6.1 Genre masculin

- Effets sur les paramètres du sperme

Hauser *et al.* (2006) ont cherché les corrélations entre l'excrétion urinaire de métabolite du DEHP, du DnBP, du BBzP et la qualité des spermatozoïdes. Quatre cent soixante-trois hommes ont été recrutés dans le Massachusetts lors d'une consultation pour analyse spermatique en raison d'une infertilité. L'étude utilise les critères de l'OMS pour évaluer la qualité des éjaculats : < 20 millions / ml ; moins de 50 % des spermatozoïdes mobiles, moins de 4% des spermatozoïdes morphologiquement normaux. Le groupe de référence est constitué de ceux ayant des résultats au-dessus des valeurs citées. Un seul échantillon d'urine est prélevé pour l'analyse des métabolites. Les résultats montrent une relation dose réponse entre l'excrétion urinaire de métabolites du DnBP et la diminution du nombre de spermatozoïdes au ml ou de leur mobilité. Les résultats pour les autres phtalates ne sont pas significatifs.

- Effets sur les hormones de la reproduction

Dans une étude de type exposés/non exposés réalisée en Chine, 74 hommes exposés au sein d'une usine de polychlorure de vinyle au DnBP et au DEHP sont comparés à 63 hommes non exposés appariés sur l'âge et la consommation tabagique (Pan *et al.*, 2006). Les concentrations urinaires des métabolites MnBP (DnBP) et MEHP (DEHP) et les concentrations plasmatiques de FSH, LH, testostérone et E2 (oestradiol) sont déterminées. Le MnBP et le MEHP sont détectés chez tous les hommes à l'exception d'un homme non exposé. Les travailleurs exposés ont des taux de MnBP et MEHP significativement plus élevés que les non exposés, traduisant ainsi la réalité de l'exposition (respectivement 644,3 versus 129,6 µg/g de créatinine pour MnBP et 565,7 versus 5,7 µg/g de créatinine pour le MEHP). Une corrélation négative entre la concentration en testostérone libre sérique et la concentration urinaire de MnBP ($r = -0,24$; $p = 0,006$) et MEHP ($r = -0,24$; $p = 0,005$) est mise en évidence. Les exposés ont un taux de testostérone significativement plus bas que les non exposés ($8,4 \pm 1,5$ versus $9,7 \pm 1,4$ µg/L, $p = 0,019$). Un biais dans le mode de prélèvement (1 seul prélèvement sanguin et urinaire) est évoqué par les auteurs, en raison des fortes fluctuations des taux hormonaux et des temps de demi-vies des phtalates relativement rapides. Néanmoins, la corrélation négative avec la testostérone est en accord avec celle retrouvée dans l'étude de Duty (Duty *et al.*, 2005).

Dans une étude expérimentale humaine, 26 jeunes hommes volontaires se sont appliqués quotidiennement et pendant deux semaines une crème standard sur l'ensemble du corps à raison de 2 mg/cm² (Janjua, *et al.*, 2007). La première semaine la crème n'est pas modifiée, alors que la deuxième semaine on ajoute 2 % en masse de di-éthyl-phtalate (DEP), 2 % de di-n-butyl-phtalate (DnBP) et 2 % de butyl-parabène (BP). Les métabolites sériques de ces substances sont dosés à intervalles de temps réguliers ainsi que le taux de certaines hormones : hormone stimulant les follicules (FSH), hormone lutéinisante (LH), testostérone, œstradiol, inhibine B, hormone stimulant la thyroïde (TSH), thyroxine libre (FT4), triiodothyroxine totale (T3) et thyroxine totale (T4). Les résultats montrent qu'il y a bien un passage percutané des phtalates et du parabène testés.

Cependant, les taux sériques des hormones recherchées ne sont pas modifiés (Janjua, *et al.*, 2007).

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

Aucune de ces études n'est ni réellement spécifique du DnBP et ni capable d'identifier une relation dose/réponse reliant une exposition au DnBP et une altération de la qualité du sperme. De ce fait aucune de ces études ne peut être utilisée pour la construction de la VLEP du DnBP.

5.1.6.2 Genre féminin

Peu d'études ont cherché à évaluer les conséquences d'une exposition *in utero* aux phtalates sur le développement de l'appareil génital des nouveau-nés de sexe féminin. D'autres études s'intéressant à la fertilité et l'appareil reproducteur de la femme ont évalué les risques de puberté précoce ou d'endométriose en relation avec les concentrations plasmatiques ou urinaires de phtalates ou de leurs métabolites (Inserm, 2011). Seules les études pouvant avoir un intérêt en vue de l'élaboration de la VLEP sont reprises dans ce chapitre. Elles concernent l'exposition de femmes adultes et en particulier les femmes enceintes, à l'exception des expositions en fin de grossesse qui ne sont pas compatibles avec une exposition professionnelle.

- Endométriose

Trois études évaluant l'impact possible d'une exposition des femmes aux phtalates sur le risque d'endométriose ont été répertoriées (Cobellis *et al.* 2003 cité par Inserm 2011, Reddy *et al.* 2006 cité par Inserm 2011, Itoh *et al.* 2009), les 2 plus récentes traitent entre autre du DnBP.

Reddy *et al.* ont étudié 49 femmes infertiles atteintes d'endométriose pelvienne diagnostiquée par coelioscopie à l'hôpital, ainsi que 38 femmes infertiles et 21 femmes fertiles ayant subi une coelioscopie pour d'autres problèmes gynécologiques (Reddy *et al.*, cité par Inserm 2011). Cette étude a montré des niveaux sanguins moyens de DEHP, DNOP, BBzP et DnBP plus élevés dans le groupe des femmes atteintes d'endométriose (respectivement 2,44, 3,32, 0,66 et 0,44 g/L) que dans les deux groupes de femmes sans endométriose. Une tendance à l'augmentation des niveaux sanguins pour ces composés était suggérée avec le degré de sévérité d'endométriose.

Les études suggérant un lien positif entre l'exposition à plusieurs phtalates et le risque d'endométriose possèdent cependant quelques limites importantes. Elles s'appuient sur des dosages sanguins de phtalates qui ont une demi-vie très courte (< 1 heure pour le DEHP). La mesure de l'exposition rétrospective, au moment de l'examen clinique, est ainsi problématique. De plus, les phtalates dosés peuvent être issus du matériel utilisé pour les prélèvements sanguins. Aucune autre information permettant d'exclure une contamination, différentielle ou non, des prélèvements sanguins n'est apportée par ces études. De plus, les résultats de ces études sont descriptifs et ne tiennent pas compte de facteurs de confusion possibles, excepté l'âge des femmes (Inserm, 2011).

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

- Fonction thyroïdienne

Récemment des chercheurs ont étudié l'exposition de femmes enceintes aux phtalates et certains indicateurs de la fonction thyroïdienne (Huang *et al.*, 2007). Des échantillons de sérum et d'urine ont été prélevés chez 76 femmes enceintes taïwanaises au cours du deuxième trimestre de grossesse. Les dosages hormonaux sériques incluaient : l'hormone stimulant la thyroïde (TSH), la triiodothyronine (T3), la thyroxine (T4) et la thyroxine libre (FT4). Les dosages urinaires portaient sur trois monoesters phtaliques: mono-butyl-phtalate (MnBP métabolite du DnBP), mono-éthyl-phtalate (MEP) et mono-éthylhexyl-phtalate (MEHP). Les taux médians urinaires de MnBP, MEP et MEHP étaient de 81,8, 27,7 et 20,6 ng/ml. Des corrélations légèrement négatives mais significatives ont été trouvées entre T4 et MnBP urinaire ($R = -0,248$, $P < 0,05$) et entre FT4 et MnBP urinaire ($R = -0,368$, $P < 0,05$). Après ajustement sur l'âge, l'index de masse corporel et la parité, les niveaux de MnBP urinaires ont montré des associations négatives avec des FT4 et T4 (FT4 : $R = -0,110$, $P < 0,001$); T4 : $R = -0,112$, $P = 0,003$). Les auteurs concluent que l'exposition au di-n-butyl-phtalate (DnBP) peut affecter l'activité thyroïdienne chez les femmes enceintes, mais le mécanisme de cet effet n'est pas clairement élucidé. De nouvelles études sont nécessaires pour élucider le mécanisme d'action et examiner si les autres facteurs liés à l'exposition au DnBP changent la fonction de la thyroïde.

- Glande mammaire

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

En conclusion chez la femme, peu d'études ont évalué le rôle possible de l'exposition aux phtalates en lien avec la toxicité sur la reproduction chez les femmes. Seules quelques

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

5.1.6.3 Effets sur le développement *in utero*

- Effet sur la distance anogénitale

L'équipe de Swan (Swan *et al.*, 2005, 2008) a étudié les liens entre exposition prénatale aux phtalates et la distance anogénitale.

Une première étude épidémiologique a été publiée en 2005 par Swan *et al.* sur une cohorte de 346 femmes enceintes (Swan, 2005). Elle décrit une corrélation positive entre les concentrations des principaux métabolites du DnBP (le MnBP) ainsi que de trois autres métabolites des phtalates retrouvés dans l'urine des mères au cours de la grossesse et l'incidence d'apparition de malformations génitales décrites lors d'un examen postnatal (moyenne 12,6 mois après la naissance) des 85 enfants mâles retenus pour la poursuite de l'étude. Parmi ces 85 enfants pour lesquels un examen d'urine de la mère avait été réalisé, 25 présentaient une diminution de l'index anogénital (distance anogénitale/poids) de 18,3 % en moyenne. Parmi ces enfants, 20 % présentaient un trouble uni ou bilatéral de la migration testiculaire, et une proportion plus faible (non indiquée) présentait une diminution de la taille de la verge et une hypoplasie scrotale. La concentration moyenne des métabolites phtaliques associés à un index anogénital court et un trouble de la migration testiculaire est similaire à celles trouvées chez 25 % de la population féminine des USA (échantillon national) (Silva *et al.*, 2004). Il en ressort que des niveaux d'exposition habituels des femmes pourraient, lors d'une grossesse, être responsable d'atteinte subtile des organes reproducteurs mâle. Ceci indiquerait que les humains pourraient être plus sensibles que les rongeurs à une exposition prénatale aux phtalates. Sharpe souligne l'importance de cette première étude épidémiologique humaine menée par Swan *et al.*, car elle relance l'importance du rôle que l'exposition aux phtalates pendant la grossesse pourrait jouer dans l'étiologie des désordres reproductifs chez l'homme (Sharpe, 2005).

En 2008, Swan *et al.* ont publié une nouvelle étude sur 106 nourrissons mâles examinés entre 2 et 36 mois lors de la première visite postnatale (moyenne : 12,8 mois). Les dosages de métabolites MEP, MnBP, MEHP, MEHHP et MEOHP (correspondant respectivement aux phtalates parents suivants : DEP, DnBP et DEHP pour les trois derniers) sont effectués dans les urines à 28,6 semaines d'aménorrhée en moyenne. Les concentrations des métabolites sont distribuées en quartiles et un score total prenant en compte tous les phtalates est calculé (score de 0 à 15). Les seins, testicules, pénis sont examinés chez le nouveau-né ainsi que la distance anogénitale. Les concentrations urinaires (MEP, MnBP, MEHP, MEHHP, MEOHP) sont inversement corrélées avec la distance anogénitale. Les concentrations urinaires moyennes des métabolites du DEHP (MEHP, MEHHP, MEOHP) et de MEP sont supérieures dans le groupe avec une distance anogénitale plus courte (Inserm, 2011).

En 2006, Marsee *et al.* ont estimé les expositions aux phtalates de 214 mères ayant accouché de garçon avec une distance anogénitale réduite, en dosant les métabolites urinaires de 5 phtalates connus pour leurs effets sur le développement des organes sexuels (di-n-butyl-phtalate (DnBP), diéthyl-phtalate (DEP), butylbenzyl-phtalate (BBzP), diisobutyl-phtalate (DiBP)) et di-2-éthylhexyl-phtalate (DEHP)) (Marsee, 2006). Les expositions médianes et 95^{ème} percentile sont respectivement de : 0,99 et 2,68 µg/kg/j pour le DnBP ; 6,64 et 112,3 µg/kg/j pour le DEP ; 0,50 et 2,47 µg/kg/j pour le BBP ; 1,32 et 9,32 µg/kg/j pour le DEHP. Les auteurs estiment que ces expositions sont très inférieures aux seuils d'effets dérivés par l'US-EPA à partir des études chez

l'animal : 100 µg/kg/j (DnBP), 800 µg/kg/j (DEP), 200 µg/kg/j (BBzP), et 20 µg/kg/j (DEHP). Toutefois, ces résultats ne sont pas comparés à un groupe « témoins » c'est-à-dire de nouveau-nés mâles ayant une distance anogénitale normale. De plus, les cofacteurs comme la consommation d'alcool et/ou de tabac ne sont pas pris en compte. Ces résultats doivent donc être interprétés avec précaution.

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

L'examen des nouveau-nés met en évidence une distance anogénitale plus courte dans le groupe à haute concentration de MnBP dans le fluide amniotique comparé au groupe à concentration plus basse (groupes dichotomisés en fonction de la médiane de MnBP) chez les nouveau-nés filles (13,9 versus 17,6 mm, $p=0,024$). Le même profil est retrouvé pour le MEHP amniotique. L'index de distance anogénitale en fonction du poids ou de la taille est également plus court dans le groupe à haute concentration en MnBP chez les filles. A l'inverse, chez les garçons cette différence n'est pas observée. Les auteurs suggèrent une plus grande sensibilité des fœtus féminins à un effet anti-androgène des phtalates pour expliquer la différence d'effet retrouvée en fonction du sexe. Il faut noter malgré les résultats intéressants l'effectif réduit de cette étude (31 filles, 33 garçons) (Inserm, 2011).

Si de nombreuses questions restent posées (par exemple comment expliquer les différences en fonction du sexe dans l'étude de Huang), les résultats de l'étude de Swan, qui présente l'effectif le plus important de garçons examinés, montrent une diminution de la distance anogénitale, ce qui suggère une action des phtalates sur l'androgénisation du fœtus. D'autres études sur des effectifs plus larges sont nécessaires pour confirmer ces premiers résultats (Inserm, 2011).

- Hypospadias

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

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

Zhang *et al.* (2009), à Shangaï, se sont intéressés aux relations entre phtalates et poids de naissance. Ainsi, les cas représentent 88 nouveau-nés à faible poids de naissance (âge gestationnel ≥ 37 semaines, poids $< 2\ 500$ g), 113 nouveau-nés de poids normal (≥ 2500 g et âge gestationnel ≥ 37 semaines) constituant le groupe témoin. Des prélèvements de sang du cordon, du méconium et du sang maternel ont été effectués. Trois phtalates (DEP, DnBP et DEHP) et deux de leurs métabolites (MnBP et MEHP) ont été recherchés dans le sang du cordon et le méconium ainsi que dans le sang maternel. Plus de 70 % des échantillons ont des niveaux quantifiables de phtalates. Seuls le MnBP et le MEHP ont été détectés dans le méconium. Des concentrations plus élevées de DnBP et MEHP ont été retrouvées dans le sang du cordon des nouveau-nés de petits poids, comparé au groupe à poids normal (le groupe des nouveau-nés de petits poids a respectivement des médianes de 2,7 mg/L versus 1,8 mg/L, $p<0,01$ et 2,5 mg/L versus 1,1 mg/L, $p<0,001$). Dans le méconium, les valeurs de MnBP et MEHP sont deux fois plus élevées dans le groupe de petit poids comparé au groupe témoins ($p<0,005$). Après prise en compte des possibles

variables de confusion, les auteurs suggèrent que l'exposition au DnBP *in utero* (sang cordon, méconium) est associée à un plus faible poids de naissance et l'exposition au DEHP avec une taille plus petite. Le fait d'être dans le 4^e quartile pour le DnBP et le MEHP dans le sang du cordon augmente le risque d'avoir un poids de naissance inférieur à 2 500g (respectivement OR=3,54 [1,54-6,15] p=0,008 ; OR=2,05 [1,17-3,70] p=0,05). Dans le méconium ce risque est également augmenté pour le MnBP (OR=4,66 [2,14-6,85] p<0,001) et le MEHP (OR=3,23 [1,31-5,94] p=0,04). Les auteurs concluent que l'exposition à ces phtalates est associée, avec un effet dose, à un plus bas poids de naissance chez le nouveau-né (Inserm, 2011).

5.2. Toxicité chez l'animal

Les données issues de l'expérimentation animale sont beaucoup plus fournies que celles chez l'Homme. Cependant il est important de noter que la voie d'exposition la plus fréquemment considérée reste la voie orale.

5.2.1 Toxicité aiguë

Le DnBP est peu toxique après une exposition unique à forte dose. La DL₅₀ du DnBP par voie orale varie entre 6,3 et 8 g/kg chez le rat et entre 4,8 et 5,3 g/kg chez la souris. La DL₅₀ du DnBP par voie cutanée chez le lapin est supérieure à 20 g/kg (Smith *et al.* 1953 ; BASF, 1961 ; BIBRA, 1987 ; RTECS, 1993a, 1993d cités dans CE, 2003).

Par inhalation, la CL₅₀ chez le rat est supérieure à 15,68 mg/L après 4 heures d'exposition et égale à 25 mg/L chez la souris après 2 heures d'exposition (Voronin, 1975 ; Greenough *et al.* 1981 cités par CE, 2003). Les décès observés s'accompagnent d'irritation des muqueuses des yeux et du tractus respiratoire supérieur, d'ataxie et de paralysie des membres arrières. Des irritations nasales similaires sont observées chez le chat exposé 5,5 heures à 1,1 mg/L de DnBP, l'exposition à des concentrations plus élevées (11 mg/L) induisant salivation excessive et agitation (BUA, 1987). Un rétablissement rapide est constaté chez le chat après arrêt de l'exposition.

5.2.2 Irritation

Deux études conduites selon les lignes directrices de l'OCDE (n°404 et 405) montrent des signes légers d'irritation cutanée ou oculaire du DnBP chez le lapin (BASF, 1990a ; BASF, 1990b cités dans CE, 2003).

Par voie aérienne, le DnBP n'est pas considéré irritant après une exposition 6 heures/j, 5 jours/semaine durant 4 semaines jusqu'à 509 mg.m⁻³ (Gamer *et al.* 2000 cité par CE, 2003 et ECHA, 2012a)

5.2.3 Sensibilisation

Deux études, l'une conduite selon la ligne directrice n°406 de l'OCDE et l'autre selon les recommandations de la Food and Drug Administration (FDA) ont montré l'absence de sensibilisation (Greenough *et al.* 1981 ; BASF, 1990c cité par CE, 2003).

5.2.4 Toxicité par doses répétées

5.2.4.1 Toxicité subaiguë

Par inhalation, dans une étude chez le rat Sprague-Dawley exposé pendant 5 jours (6 heures/jour) à des concentrations de 0 ; 0,5 ; 2,5 et 7 ppm (soit 0, 6, 28 et 80 mg.m⁻³), aucun effet sur le poids corporel, du foie et des reins n'a été observé. Des modifications enzymatiques ont été rapportées dans les poumons aux 2 plus fortes doses mais pas au niveau hépatique. Les activités transaminases ALAT (Alanine-Amino Transférase) et ASAT (Aspartate amino transférase) ainsi que l'albumine plasmatiques sont significativement augmentées à 7 ppm (Walseth *et al.*, 1984).

Dans une étude BPL menée selon les lignes directrices OCDE n° 407 et 412, des rats Wistar ont été exposés 6 heures/jour, 5 jours/semaine, pendant 4 semaines (exposition « nose-only ») à des

concentrations de 0 – 1,18 – 5,57 – 49,3 ou 509 mg.m⁻³ de DnBP sous forme d'aérosol (diamètre aérodynamique moyen de 1,5 à 1,9 µm). Il n'a pas été constaté d'effet systémique; toutefois, à toutes les concentrations, des lésions histologiques (hyperplasie de grade I à II et métaplasie) non inflammatoires des voies aériennes supérieures sont décrites. Il est conclu à un NOAEC de 509 mg.m⁻³ pour les effets systémiques et neurologiques (plus forte dose testée). Le LOAEC étant de 1,18 mg.m⁻³ pour les effets locaux respiratoires (Gamer *et al.* 2000, rapport confidentiel BASF cité par CE, 2003 et ECHA, 2012a).

5.2.4.2 Toxicité subchronique

Exposition par inhalation

Par inhalation, aucun signe de toxicité clinique n'est décelé chez le rat mâle exposé en continue à des concentrations de DnBP de 0,098 ; 0,252 et 0,98 mg.m⁻³ durant 93 jours (Men'shikova, 1971 cité par CE 2003). Les auteurs rapportent une augmentation du taux de gamma-globulines ainsi qu'une diminution du nombre de leucocytes. Ces modifications de paramètres sanguins étant uniquement présentées sous forme de graphique, les résultats n'ont pas été retenus par les experts de l'ECB. Kawano obtient des variations des paramètres hématologiques et biologiques du même ordre, cependant sans relation dose-effet, pour des rats Wistar mâles exposés 6 heure/jour, 6 jours/semaine durant 6 mois à 0,5 ou 50 mg.m⁻³ de DnBP sous forme d'aérosol liquide (« mist ») (Kawano, 1980¹⁰). A partir de cette dernière étude on peut définir un NOAEC de 0,5 mg.m⁻³.

Exposition par ingestion

Par voie orale, la toxicité subchronique du DnBP chez les rongeurs a fait l'objet de 10 publications, dont 2 chez la souris et 8 chez le rat.

Chez la souris, l'étude la plus pertinente indique un retard de croissance significatif chez la souris B6C3F1 à partir d'une dose de DnBP quotidienne dans l'alimentation pendant 13 semaines de 812 mg/kg pour les mâles et 971 mg/kg pour les femelles (doses testées chez les mâles (n=10/ groupe): 0, 163, 353, 812, 1 601 et 3689 mg/kg/j ; doses testées chez les femelles (n=10/ groupe) : 0, 238, 486, 971, 2137, 4278 mg/kg/j) (NTP, 1995). Chez le mâle, une diminution significative du poids de l'épididyme gauche ainsi qu'une augmentation du nombre de spermatozoïdes à 2 têtes sont observées pour la plus haute dose (3 689 mg/kg). Chez la femelle, une augmentation significative du poids relatif et absolu des reins est constatée pour toutes les doses testées. Des paramètres hématologiques sont de plus modifiés à plus hautes doses (diminution de l'hématocrite pour 4278 mg/kg). Enfin, des altérations du cytoplasme hépatocellulaire sont rapportées à partir de 1601 et 4278 mg/kg respectivement pour les mâles et les femelles. Un NOAEL de 353 mg/kg/j est déduit de cette étude pour les mâles tandis que seul un LOAEL (238 mg/kg/j) est disponible pour les femelles.

Dans une étude de qualité limitée, Ota *et al.* (1973, 1974 cité par CE, 2003) constatent chez des souris exposées à 5 000 mg/kg/j durant 90 jours, des modifications histologiques hépatiques (dégénérescences vacuolaires et nécroses) et rénales (présences de kystes et dégénérescence des cellules épithéliales au sein des tubules rénaux).

Chez le rat, dans une étude ancienne (1953), Smith a établi un NOAEL de 125 mg/kg/j chez le rat mâle exposé pendant 1 an via l'alimentation à des doses de 5, 25, 125 et 625 mg/kg/j. Cependant, cette valeur correspond à la survie des animaux, l'auteur n'ayant pas examiné les poids des organes, effet qui semble apparaître à plus faible dose. Aux doses inférieures ou égales à 125 mg/kg/j aucun effet n'a été observé sur : la survie, la croissance, la prise de nourriture, les paramètres hématologiques. D'après le RAR (CE, 2003), cette étude présente des limites

¹⁰ Cette étude a été publiée dans un journal japonais.

majeures : souche de rat non précisée, seul un des deux sexes a été étudié, certains paramètres biochimiques et le poids des organes n'ont pas été évalués.

Nikoronow *et al.* (1973) proposent un LOAEL de 125 mg/kg/j pour une exposition par gavage durant 3 mois de rats Wistar mâles et femelles (doses : 120 et 1200 mg/kg/j). Le seul effet observé correspondait à une augmentation du poids relatif du foie.

Schilling *et al.* (1992 cité par ECHA, 2012a) ont investigué les effets toxiques du DnBP sur le rat Wistar dans une étude d'une durée de 3 mois suivant les directives de l'OCDE (n° 408) et ont établi un NOAEL de 152 mg/kg/j. Les rats ont été exposés par voie orale à 30, 152 et 752 mg/kg/j de DnBP dans l'alimentation pendant 3 mois. Les effets observés à la dose supérieure (soit 752 mg/kg/j) sont des modifications de paramètres hématologiques (diminution d'hématocrite et du nombre d'érythrocytes) et biologiques (augmentation des niveaux sériques en albumine et en glucose, diminution du taux de triglycérides et augmentation de l'activité de l'oxydase PCoA indicateur de prolifération des péroxysomes). Aucun effet testiculaire n'est observé et les tests pratiqués n'ont décelé aucun symptôme de neuropathie.

L'administration quotidienne *via* l'alimentation de 250 ou 2500 mg/kg/j pendant 36 jours à des rats Wistar mâles induit des altérations ultramicroscopiques du foie à la dose de 250 mg/kg/j, encore plus marquées pour une dose plus élevée (2 500 mg/kg/j) (Murakami *et al.*, 1986 cité par IPCS/WHO, 1997). Un LOAEL est fixé à 250 mg/kg/j.

Une autre étude propose un NOAEL pour l'augmentation de l'activité de l'oxydase PCoA à 104 mg/kg/j pour 4 semaines d'exposition du rat Wistar. Cependant un autre effet adverse est observé pour l'ensemble des doses étudiées (accroissement significatif du poids des reins: LOAEL : 51,5 mg/kg/j) signifiant que la prolifération péroxysomale hépatique n'est pas la première pathologie à se manifester (BIBRA, 1990 cité par CE, 2003).

La prolifération de peroxysomes hépatiques (PPH) est induite par de nombreux phtalates chez les rongeurs. Cet effet se manifeste notamment par l'augmentation de l'activité des enzymes 11-, 12-acide laurique hydroxylase (LAH-11 et LAH-12) et palmitoyl CoA oxydase (PCoA). Dans une étude chez le rat Wistar exposés au DnBP sur une durée de 3 mois aux doses de 0, 30, 152, et 752 mg/kg/j, la PPH était déterminée par mesure histochimique rapportant le nombre et la taille des péroxysomes. Le NOAEL déterminé par les auteurs est de 152 mg/kg/j (Kaufmann, 1992 cité par CE, 2003).

Le plus petit NOAEL observé pour l'effet PPH est issu de l'étude de Jansen *et al.* (1993 cité par CE, 2003). Ces derniers proposent les NOAEL de 60,6 et 19,9 mg/kg/j s'appliquant respectivement aux augmentations d'activité des PCoA et LAH-11/LAH-12 chez le rat Wistar exposé durant 2 semaines aux doses de 1,1 ; 5,2 ; 19,9 ; 60,6 et 215,5 mg/kg/j.

Les travaux du NTP sur des rats F344 mâles et femelles, semblables à ceux effectués sur la souris (exposition orale 13 semaines ; 10 mâles et 10 femelles / groupe ; dose chez les mâles: 0, 176, 359, 720, 1 540, 2 964 mg/kg/j ; doses chez les femelles: 0, 178, 356, 712, 1 413, 2943 mg/kg/j) montrent des effets équivalents (modifications des paramètres sanguins, poids relatif du foie). Un NOAEL de 177 mg/kg/j basé sur une hépatomégalie, une prolifération des péroxysomes et une anémie légère aux doses supérieures peut être déduit pour les mâles et les femelles. Les effets statistiquement significatifs (parfois avec une relation dose réponse) observés à la dose supérieure sont : diminution de l'hémoglobine et du nombre d'érythrocytes (chez les mâles, relation dose réponse), augmentation de l'activité PcoA (mâles et femelles avec relation dose réponse), augmentation du poids relatif des reins et du foie (chez les mâles, seulement significatif à la dose suivante chez les femelles) (NTP, 1995). Des lésions histologiques sont observées au niveau du foie chez les mâles et les femelles à partir de 712/720 mg/kg/j. La sévérité de ces lésions augmente aux plus fortes doses testées.

Des effets testiculaires sont également identifiés chez les rongeurs. Ces effets entraînant des conséquences sur la fertilité seront présentés au chapitre traitant de la reprotoxicité.

Exposition par contact cutanée

Par voie cutanée, une étude menée dans des conditions expérimentales inadéquates a été réalisée chez le lapin, pendant 90 jours. Le seul effet toxique pertinent décrit est une atteinte rénale peu sévère (Lehman, *et al.*, 1955).

En conclusion des études animales par voie orale, chez le rat, la plus petite dose avec effet (LOAEL) dans une étude de 3 mois suivant les lignes directrices de l'OCDE (n°408) est égale à 752 mg/kg pc/j, le NOAEL est égal à 152 mg/kg pc/j. Les effets observés sont des modifications des paramètres hématologiques (diminution de l'hématocrite et du nombre d'érythrocytes) et biologiques (augmentation des niveaux sériques en albumine et en glucose, diminution du taux de triglycérides et augmentation de l'activité de l'oxydase PCoA, indicateur de prolifération des péroxysomes). Aucun effet sur les testicules n'a été décrit dans cette étude (Schilling *et al.* 1992 cité par ÉCHA, 2012a).

Sur la base des travaux conduit par le NTP chez le rat exposé pendant 13 semaines, le LOAEL est égal à 176 mg/kg/j et le NOAEL à 356 mg/kg/j. Les effets observés sont une augmentation du poids du foie et des reins (uniquement chez le mâle), une augmentation de l'activité de l'oxydase PCoA, indicateur de prolifération des péroxysomes ainsi que des modifications des paramètres hématologiques (diminution de l'hémoglobine et du nombre d'érythrocytes observée uniquement chez le mâle).

Chez la souris, dans l'étude la plus pertinente conduite pendant 13 semaines, le LOAEL chez le mâle est égal à 812 mg/kg pc/j et le NOAEL est égal à 353 mg/kg pc/j. Les effets observés sont, chez le mâle, une diminution significative du poids de l'épididyme gauche, et une augmentation du nombre de spermatozoïdes à 2 têtes dans les testicules. Chez la femelle, une augmentation du poids relatif et absolu des reins est observée, aucun NOAEL n'a pu être déterminé. Seul un LOAEL de 238 mg/kg est disponible pour les femelles (NTP, 1995).

5.2.4.3 Toxicité chronique

Dans une étude par inhalation, Kawano (1980) obtient des variations des paramètres hématologiques et biologiques du même ordre que celles observées dans l'étude de Men'shikova (1971 cité par CE, 2003). Cependant aucune relation dose-effet n'a été mise en évidence chez des rats Wistar mâles exposés 6 heures/jour, 6 jours/semaine durant 6 mois à 50 mg.m⁻³ de DnBP sous forme d'aérosol liquide (« mist »). A partir de cette dernière étude on peut définir un NOAEC de 0,5 mg.m⁻³.

Deux études de toxicité orale chez le rat d'une durée de 12 mois sont disponibles (Smith, 1953 ; Nikonorow *et al.*, 1973). Dans ces études anciennes, la caractérisation des expositions est mauvaise. Seuls les NOAEL ont été identifiés (pas de LOAEL), respectivement à 125 et 62,5 mg/kg pc/j.

Tableau 2 : Récapitulatif des études expérimentales chez l'animal par doses répétées

Espèce/souche	Type d'étude (protocole)	Voie	Durée	animaux/groupe	NOAEL	LOAEL	Effet	Etude Source
Rat Wistar	Subchronique (NR)	orale	3 mois	NR		125 mg/kg/j	Augmentation du poids relatif du foie	Nikoronow, 1973
Rat Wistar	Subchronique (OCDE 408)	orale	3 mois	NR	152 mg/kg/j	752 mg/kg/j	Diminution de l'hématocrite et du nombre d'érythrocytes et augmentation des taux sériques d'albumine et de glucose, diminution des triglycérides et augmentation des marqueurs de prolifération des peroxyosomes	Schilling, 1992 (cité par CE, 2003)
Rat Wistar	Subchronique (NR)	orale	36 jours	NR		250 mg/kg/j	Altérations hépatiques	Murakami, 1986 (cité par IPCS/WHO, 1997)
Rat Wistar	Subchronique (NR)	orale	4 semaines	NR	104 mg/kg/j	51,5 mg/kg/j	Augmentation du poids des reins Augmentation des marqueurs de prolifération des peroxyosomes	BIBRA, 1990 cité par CE, 2003)
Rat Wistar	Subchronique (NR)	orale	3 mois	NR	152 mg/kg/j		Augmentation des marqueurs de prolifération des peroxyosomes	Kaufmann, 1992 cité par CE, 2003)
Rat Wistar	Subchronique (NR)	orale	2 semaines	NR	60,6 mg/kg/j		Augmentation des marqueurs de prolifération des peroxyosomes	Jansen, 1993 cité par CE, 2003)
Rat F344	Subchronique (GL USA)	orale	13 semaines	10 mâles 10 femelles	176 mg/kg/j 177 mg/kg/j		Diminution de l'hémoglobine et du nombre d'érythrocytes et augmentation du poids relatif des reins (mâle) Augmentation des marqueurs de prolifération des peroxyosomes (femelles)	NTP, 1995

Rat SD	Effets testiculaires jeune mâle	orale	4 semaines	8 mâles		250 mg/kg/j	Augmentation du poids du foie	Wang, 2004
Souris B6C3F1	Subchronique (GL USA)	orale	13 semaines	10 mâles 10 femelles	353 mg/kg/j		Retard de croissance significatif (mâle) augmentation des marqueurs de prolifération des peroxyosomes (femelles)	NTP, 1995
Rat Wistar	Subchronique (OCDE 412 et 407)	respiratoire	4 semaines	5 mâles et 5 femelles	509 mg.m ⁻³	1,18 mg/m ³	Effets systémiques et neurologiques Effets locaux sur les voies respiratoires hautes (cavité nasale et larynx)	Gamer, 2000 (cité par CE, 2003 et ECHA, 2012a)
Rat wistar	Subchronique (NR)	respiratoire	93 jours	NR	0,98 mg.m ⁻³		Aucun signe de toxicité	Men'shikova, 1971 (cité par CE, 2003)
Rat wistar	Subchronique (NR)	respiratoire	6 mois	NR	0,5 mg.m ⁻³		Modification de paramètres sanguins	Kawano, 1980

NR : non renseigné

5.2.5 Génotoxicité

Le DnBP a fait l'objet de nombreuses études de génotoxicité. Six études utilisant le test d'Ames avec ou sans activation métabolique sur plusieurs souches de *Salmonella typhimurium* sont négatives, à l'exception de 2 tests réalisés sur la souche TA 100, dont l'un est équivoque et l'autre positif sans activation métabolique à des concentrations proches des concentrations cytotoxiques. Un test sur *Saccharomyces cerevisiae* est également négatif (Kurata, 1975 cité par Omori, 1976 ; Shahin et von Borstel, 1977 ; Florin *et al.* 1979 ; Seed, 1982 ; Zimmermann *et al.* 1984 ; Agarwal *et al.*, 1985 ; Zeiger *et al.*, 1985).

Deux tests sur cellules de lymphome de souris (L5178Y) ont été réalisés, et donnent des résultats contradictoires : l'un est négatif en l'absence d'activation métabolique, l'autre est positif en présence d'activation métabolique (NTP, 1995).

Le DnBP n'induit pas d'aberrations chromosomiques ni de cassure d'ADN dans les tests réalisés.

In vivo, le DnBP conduit à des résultats négatifs chez *Drosophila melanogaster* (Izmerov *et al.* 1982 cité par CE, 2003) et chez la souris sur 2 tests de micronoyaux (BASF, 1990d cité par CE, 2003 ; NTP, 1995).

A partir de ces éléments, le DnBP est considéré comme non génotoxique (CE, 2003).

5.2.6 Cancérogénicité

Il n'existe pas d'étude pertinente à long terme de cancérogenèse disponible chez les animaux de laboratoire. Plusieurs phtalates dont le DnBP sont connus pour induire une prolifération des péroxysomes au niveau hépatique chez le rat et la souris, qui se traduit par des modifications structurales après observation au microscope électronique et des changements dans les activités enzymatiques associées aux péroxysomes.

Le NOAEL le plus faible pour ces observations est trouvé dans une étude sur des rats mâles Wistar recevant pendant deux semaines par voie orale du DnBP à 1,1 – 5,2 – 19,9 – 60,6 et 212,5 mg/kg/j. Ce NOAEL est de 19,9 mg/kg/j (Jansen, 1993 cité par CE, 2003).

Il a été suggéré une relation entre la prolifération des péroxysomes et la survenue de tumeurs hépatiques chez les rongeurs (Lapinskas, 2005). Plusieurs études ont cependant montré qu'il s'agissait d'une spécificité d'espèce, le rat et la souris étant particulièrement sensibles aux substances chimiques induisant la prolifération de péroxysomes tandis que ce type de réponse n'a pas été observé chez le cochon d'inde, les primates et les humains. Ces effets cancérigènes observés chez les rongeurs sont considérés non transposables à l'Homme.

5.2.7 Toxicité sur la reproduction

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

5.2.7.1 Effets sur la fertilité

Chez le mâle adulte

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

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

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

Une diminution du poids des vésicules séminales, de la prostate ventrale, des épididymes et des testicules a été observée chez des rats Sprague Dawley traités par gavage pendant 30 jours avec du DnBP aux doses de 100 et 500 mg/kg/j. Cet effet est moins prononcé chez les rats chez qui une hypothyroïdie a été induite par l'injection de propylthiouracyl (PTU) (Lee *et al.*, 2008). L'hypothyroïdisme pourrait ainsi protéger en partie les rats des effets du DnBP. Chez les rats PTU, une forte diminution de la métabolisation du DnBP en MnBP est observée (de près de la moitié). Une réduction de poids testiculaire est observée aussi bien chez les rats normaux et hypothyroïdiens (PTU) en réponse au DnBP. Il est donc difficile d'être certain que l'hypothyroïdisme protège le testicule des effets néfastes du DnBP mais l'effet sur le métabolisme de ce phtalate apparaît clair (Inserm, 2011).

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

des tubes séminifères à la fois dans les heures suivant le début du traitement et après 7 jours. Cet effet sur la spermatogenèse semble donc plus durable. De manière intéressante, seul l'effet sur la spermatogenèse est bloqué par un antagoniste des œstrogènes. Les effets des phtalates sur la gamétogenèse et la stéroïdogénèse peuvent donc être dissociés.

A partir de la puberté, les cellules de Sertoli ont définitivement cessé de proliférer et les variations de poids testiculaires reflètent essentiellement une atteinte germinale sans pour autant que celle-ci ait été recherchée par tous les auteurs (Inserm, 2011).

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

Chez l'adulte (plus de 60 jours), les effets des phtalates sur le testicule semblent peu prononcés à moins d'une exposition à de très fortes doses (Inserm, 2011). Ainsi Nair *et al.* (2008) relatent que 1000 mg/kg/j de DnBP administrés durant 7 jours à des rats adultes diminuent le taux de testostérone plasmatique et la densité et la viabilité des spermatozoïdes. Dans cette étude, les protocoles sont peu détaillés rendant difficile l'appréciation de la méthodologie.

Il semble donc que le testicule adulte de rat ou de lapin soit beaucoup moins sensible aux effets d'une exposition aux phtalates que le testicule foetal ou postnatal (Inserm, 2011).

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

Des publications récentes ont mis en exergue les modifications du matériel génétique et de son expression (perturbations endocriniennes) chez les rats adultes mâles, processus susceptibles d'altérer significativement la fertilité masculine. L'équipe de Ryu *et al.* a ainsi montré que l'administration de DnBP (0 – 250 – 500 ou 750 mg/kg/j durant 30 jours) à des rats Sprague-Dawley âgés de 4 semaines engendrait une altération de l'ARN testiculaire concernant notamment les gènes impliqués dans la spermatogenèse et stéroïdogénèse (Ryu *et al.*, 2007). Pour la plus forte dose (750 mg/kg/j), l'expression des gènes associés à la stéroïdogénèse (PBR, SR-B1, StAR, P450scc, and CYP17) est fortement accrue à l'inverse du gène CYP19. A ce niveau de dose (750 mg/kg/j) l'expression des récepteurs hormonaux (TR-alpha1) et des récepteurs activables par les proliférateurs de peroxyosomes gamma (PPAR-gamma) est significativement augmentée dans les testicules tandis que les taux hormonaux (androgène et œstrogène) sont significativement diminués. La connaissance des liens complexes entre ces perturbations endocriniennes et la fertilité masculine est encore lacunaire comme l'illustrent ces auteurs dans une étude ultérieure où les résultats suggèrent l'existence de mécanismes distincts entre exposition aiguë et chronique (Ryu, *et al.*, 2008).

Chez la femelle adulte

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

Etudes multigénérationnelles

Une étude de fertilité a été réalisée chez le rat COBS CD dans des conditions BPL (IRDC, 1984 cité par CE, 2003). Les mâles ont été exposés *via* l'alimentation, 60 jours avant l'accouplement, les femelles 14 jours avant l'accouplement puis pour les 2 sexes, pendant la période d'accouplement, la gestation et la lactation à des doses de 0, 5, 50 et 500 mg/kg/j. Des femelles F1 issues de mères exposées ont été elle-même directement exposées au DnBP pendant 7 semaines supplémentaires après le sevrage ; un groupe contrôle recevait de la nourriture sans DnBP. Chez les rats mâles F0 exposés, seules des augmentations du poids du foie et des reins ont été rapportées; statistiquement significatives à 500 mg/kg/j. Aucun effet sur la fertilité ou sur la descendance issue de ces rats mâles exposés n'a été observé. Chez les femelles F0 traitées, une augmentation du poids des rats a également été observée. Le poids des petits issus de mères traitées à la dose de 500 mg/kg/j est diminué à la naissance et pendant la lactation. Une diminution du poids des testicules ainsi que des lésions histologiques ont également été observés 7 semaines après le sevrage. Un NOAEL de 50 mg/kg/j basé sur la toxicité maternelle et l'embryotoxicité peut être déduit de cette étude.

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

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

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

exposées au DnBP, la fécondité est réduite. Le LOAEL pour les effets sur la fertilité est de 250 mg/kg.

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

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

Chez le rat femelle, un NOAEL de 50 mg/kg/j sur la base d'une embryotoxicité observée dans une étude sur une génération peut être établie ; un NOAEL de 500 mg/kg/j peut être dérivé de cette étude pour les rats mâles (IRDC, 1984 cité par CE, 2003).

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

Tableau 3 : Récapitulatif des études expérimentales chez l'animal sur les effets reprotoxiques du DnBP

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

5.2.7.2 Effets sur le développement

Effets *in utero*

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

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

Concernant les cellules de Leydig, chez le rat Wistar, l'administration de 500 mg/kg/j de DnBP à la femelle gestante diminue la testostérone intra-testiculaire du fœtus de manière importante (Fisher *et al.*, 2003, Scott *et al.*, 2008, Drake *et al.*, 2009, Martino-Andrade *et al.*, 2009, MacLeod *et al.*, 2010) alors que des doses de DnBP inférieures à 100 mg/kg/j n'inhibent pas de manière visible la production de testostérone durant la vie fœtale (Drake *et al.*, 2009 et Martino-Andrade *et al.*, 2009). Cependant l'administration simultanée de DnBP (100 mg/kg/j) et de DEHP (150 mg/kg/j) induit des effets semblables à une forte dose de DnBP (Martino-Andrade *et al.*, 2009).

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

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

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

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

Deux études ont délimité finement la période d'exposition minimale induisant une diminution de la distance anogénitale (Ema *et al.*, 2001, Scott *et al.*, 2008) ; cette période du 15^{ème} au 17^{ème} jour de gestation correspond à la « fenêtre de programmation mâle », un concept proposé par R. Sharpe. Ainsi chez le rat Wistar, une exposition au DnBP (150-500 mg/kg/j) durant toute la fin de la vie fœtale (du 13^{ème} au 21^{ème} jour) ou uniquement pendant la fenêtre du 15^{ème} au 17^{ème} jour diminue sensiblement également la distance anogénitale bien que dans le second cas la chute de la sécrétion de testostérone ait été très transitoire. La différenciation et le développement de nombreux organes du tractus reproducteur mâle sont androgéno-dépendants. Ainsi une diminution à la puberté ou à l'âge adulte du poids des vésicules séminales, de la prostate ventrale et du muscle levator ani-bulbocaverneux sont couramment signalés dans ces études. Un retard de l'âge de la séparation du prépuce, un indice de la puberté chez le mâle, est parfois rapporté. Une diminution du poids testiculaire ou épидидymaire est également fréquemment décrite mais il n'est pas établi si celle-ci fait suite à une atteinte directe du testicule ou est secondaire à la cryptorchidie (Inserm, 2011).

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

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

Pour déterminer la relation dose réponse des effets du DnBP sur la genèse stéroïdienne dans les testicules fœtaux, des rates Sprague-Dawley gestantes ont reçu du DnBP par gavage avec de l'huile de maïs aux doses de 0,1 ; 1,0 ; 10 ; 50 ; 100 ou 500 mg/kg/j depuis le 12^{ème} jour de gestation jusqu'au 19^{ème} jour. Les testicules des fœtus mâles ont été isolés le 19 jour et les changements d'expression de gène ont été évalués quantitativement par PCR en temps réel. La concentration de testostérone testiculaire fœtale a été mesurée par un test radio immunologique. L'exposition au DnBP génère une réduction dose dépendante significative des concentrations de mRNA et de protéine du récepteur « scavenger », de la protéine régulatrice des stéroïdes (StAR), du cytochrome P450, du 3beta-hydroxystéroïde déshydrogénase et du cytochrome P450c17. La quantité/concentration de testostérone testiculaire a été réduite à partir de 50 mg/kg/j. Ces résultats montrent une réduction dose dépendante de l'expression des gènes clés et des protéines impliquées dans le transport du cholestérol et dans la genèse stéroïdienne

accompagnée d'une réduction de la testostérone dans les testicules fœtaux après exposition maternelle à des niveaux de dose inférieurs aux niveaux où des effets indésirables sont détectés sur les organes reproducteurs mâles en développement. Les changements observés (expression de gène et de protéine) peuvent servir d'indicateurs précoces de la réponse testiculaire aux DnBP (Lehmann *et al.*, 2004).

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

Gaido *et al.* (2007) ont étudié en détail les effets des phtalates chez la souris. Trois souches de souris différentes, CD1, C57Bl/6J et C3H/HeJ, ainsi que trois phtalates ont été utilisés, DnBP, MnBP et MEHP. Les gavages ont été réalisés pendant la gestation (18^{ème} jour, 15^{ème} - 16^{ème} jour, 15^{ème} - 17^{ème} jour et 14^{ème} - 17^{ème} jour) avec des doses de 250 à 1500 mg/kg/j. Les protocoles utilisés sont semblables à ceux décrits chez le rat. Cependant aucune diminution de la testostérone testiculaire fœtale n'a pu être observée par ces auteurs, quelle que soit la dose, la nature du phtalate ou la souche de souris. Par exemple, une exposition à 1 500 mg/kg/j de DnBP (14^{ème} - 16^{ème} jour) ne diminue pas la production de testostérone dans la souche C57Bl/6J. Par ailleurs, aucune diminution des ARNm de StAR, P450scc, Cyp17a1 ou *Srb1* n'est observée. Les auteurs ont également mesuré le taux de MnBP, lors d'une exposition au DnBP, dans le plasma fœtal et maternel et observe des doses similaires à celles décrites chez le rat. Ce point indique donc que la métabolisation du phtalate ne semble pas être différente chez ces deux espèces. Il apparaît donc que chez la souris, les gènes impliqués dans le transport du cholestérol et la biosynthèse de la testostérone, ne sont pas affectés par une exposition *in utero* aux phtalates. Ce travail pose la question de savoir si les effets observés chez le rat sont spécifiques de cette dernière espèce (Inserm, 2011).

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

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

aux phtalates *in utero* est poursuivie par une exposition *via* la lactation jusqu'au 15^{ème} jour postnatal. Cette diminution de la prolifération des cellules de Sertoli semble être la cause de la diminution du poids testiculaire à la naissance lors d'une exposition aux phtalates pendant la gestation rapportée par de nombreux auteurs et également retrouvée chez le lapin (Inserm, 2011).

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

Concernant les cellules germinales, le phénomène le plus visible immédiatement après une exposition *in utero* aux phtalates est l'apparition de cellules germinales anormales, multinucléées. Ces cellules ont été décrites chez le rat et la souris dans diverses souches et principalement en réponse au DnBP et au DEHP (Fisher *et al.*, 2003, Borch *et al.*, 2005, Gaido *et al.*, 2007, Johnson *et al.*, 2008, Boekelheide *et al.*, 2009, Martino-Andrade *et al.*, 2009). Il semble que des doses supérieures ou égales à 100 mg/kg/j soient nécessaires pour induire l'apparition de ces gonocytes multinucléés. Ces cellules sont observées en fin de vie fœtale et disparaissent peu après la naissance vers 10 jours (Fisher *et al.*, 2003). A cet âge, une diminution du nombre des cellules germinales est observée. Les mécanismes moléculaires impliqués sont totalement inconnus mais un lien avec la chute du taux de testostérone peut clairement être exclu puisque cet effet est retrouvé chez la souris (Inserm, 2011).

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

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

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

Dans une étude sur des primates non humains, McKinell *et al.* (2009) ont exposé des femelles marmouset gestantes à 500 mg/kg/j de MnBP entre la 7^{ème} et la 15^{ème} semaine de gestation, période durant laquelle se mettent en place les tubes séminifères et débute la sécrétion de testostérone ; 6 mâles ont été autopsiés à la naissance, 5 durant la vie adulte (18- 21 mois). Par ailleurs dans un deuxième protocole, ils ont exposé des nouveau-nés (4^{ème} jour) à 500 mg/kg/j durant 14 jours. Les testicules sont examinés macroscopiquement mais également par immunohistochimie afin d'apprécier l'index de maturation des cellules germinales. L'exposition *in utero* n'a pas de conséquence notable sur les différents paramètres analysés à la naissance ou à l'âge adulte. Le taux de testostérone plasmatique est similaire entre exposés et témoins. L'analyse immunohistochimique met en évidence à la naissance chez les animaux traités des groupements inhabituels de cellules germinales chez les exposés, cellules germinales marquées principalement par OCT4, AP2 δ et c-KIT indiquant des gonocytes non différenciés. De telles agrégations cellulaires ont pu être retrouvées dans les tubes séminifères fœtaux de rats exposés au DnBP. L'exposition des marmousets nouveau-nés au MnBP se traduit par une réponse relativement hétérogène au niveau des cellules germinales. Enfin, les résultats des animaux exposés *in utero* ne mettent pas en évidence de changement à l'âge adulte. Les auteurs concluent à une absence d'effet de l'exposition au MnBP *in utero* sur le développement et la fonction testiculaire. Les effets notés sur les cellules germinales n'apparaissent pas significatifs étant donné l'hétérogénéité des réponses (Inserm, 2011).

Autres effets après une exposition *in utero*

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

Dans une étude chez la souris exposée *via* l'alimentation aux doses de 0,005 ; 0,05 et 0,5% (soit 6,25 ; 62,5 et 625 mg/kg/j), du 1^{er} au 18^{ème} jour de gestation, une diminution du nombre de naissances vivantes a été observée à la plus forte dose (Hamano *et al.*, 1977 cité par Canadian EPA, 1994). Des malformations sont également plus fréquentes dans les portées issues de ce groupe comparativement au groupe contrôle (spina bifida, exencéphalie...). A cette dose, une augmentation du poids des reins chez les mères a également été rapportée. Un NOAEL de 62,5 mg/kg/j basé sur les effets embryotoxiques et tératogènes peut être déduite de cette étude. A noter que seul un résumé de cette étude est disponible et que les doses calculées à partir des concentrations dans l'alimentation diffèrent entre le rapport Européen (CE, 2003) et le rapport de Santé Canada (Canadian EPA, 1994).

En conclusion des études sur le développement, plusieurs études ont été réalisées chez la souris et le rat. Des effets embryotoxiques et tératogènes ont été observés. Les effets les plus sensibles sont observés sur le développement de l'appareil reproducteur mâle en lien avec une activité anti-androgénique du DnBP. Les plus faibles doses associées à un effet ont été observées chez des rats. Un LOAEL de 2 mg/kg/j basé sur l'observation de la diminution spermatocytaire et des dysplasies mamelonnaires chez les nouveau-nés mâles ou femelles a été définie lors d'une exposition périnatale (Lee, 2004). Ces conditions d'exposition ne sont toutefois pas pertinentes

pour l'élaboration d'une VLEP. Un NOAEL de 10 mg/kg/j basée sur une diminution de la concentration de testostérone testiculaire (observée à 50 mg/kg/j) peut être déduit après une exposition *in utero* (du 12^{ème} au 19^{ème} jour de gestation (Lehmann *et al.*, 2004).

Tableau 4 : Récapitulatif des études animales sur la toxicité du DnBP au cours du développement (NOAEL/LOAEL en mg/kg/j)

Animal	Type d'étude (protocole)	Voie	Durée ou période	animaux/groupe	NOAEL	LOAEL	Effet	Source
Souris JCL :ICR	Développement	Orale	1 ^{er} au 18 ^{ème} jour de gestation					Hamano <i>et al.</i> , 1977 cité par Canadian EPA, 1994
Rat CD	Développement (NR)	Orale	12 ^{ème} au 21 ^{ème} jour de gestation	11 à 22	50 mg/kg/j	100 mg/kg/j	Réduction de la distance anogénitale, rétention mamelonnaire, lésions testiculaires, malformation et diminution du poids des organes reproducteurs masculins	Mylchreest <i>et al.</i> , 1998, 1999 et 2000
Rat SD	Développement (NR)	Orale	NR	NR	60 mg/kg/j	600 mg/kg/j	Diminution de la distance anogénitale, retard de la séparation prépucciale, augmentation des troubles de la migration testiculaire et diminution du taux de testostérone sérique	McKee <i>et al.</i> , 2004
Rat SD	Reproduction sur 2 générations (NR)	Orale continue de F0 à F1	Indéterminé	NR	385 mg/kg/j	mâles 52 mg/kg/j femelles 80 mg/kg/j	Diminution du poids des mères F0 Poids des organes génitaux mâles, lésions dégénératives de l'épithélium germinale testiculaire, hyperplasie interstitielle, absence ou hypoplasie de l'épididyme des mâles F1 et F2	Wine <i>et al.</i> , 1997
Rat	Développement (NR)	<i>In utero</i> et lactation	15 ^{ème} jour de gestation au 21 ^{ème} jour de lactation	8		2 mg/kg/j	Réduction des spermatoocytes testiculaires, lésions dysplasiques mamelonnaires (dégénérescence vacuolaire chez le mâle, hypoplasie des bourgeons alvéolaires chez les femelles)	Lee <i>et al.</i> , 2004
Rat SD	Développement (NR)	<i>In utero</i> et lactation	NR	NR	50 mg/kg/j	250 mg/kg/j	Atrophie testiculaire, absence ou développement anormal de l'épididyme, nombre de spermatozoïdes réduit	Zhang <i>et al.</i> , 2004
Rat SD	Activité anti-	Orale	10 jours	NR		20	Diminution du poids de la prostate	Lee <i>et al.</i> , 2007

castré	androgénique (Hershberger)				mg/kg/j	ventrale		
Rat SD	Développement fœtal (NR)	<i>In utero</i>	12 ^{ème} au 19 ^{ème} jour de gestation		10 mg/kg/j	50 mg/kg/j	Diminution du taux de testostérone testiculaire	Lehman <i>et al.</i> , 2004
Rat Wistar	Développement fœtal (NR)	<i>In utero</i>	12 ^{ème} au 21 ^{ème} jour de gestation	4 à 16	20 mg/kg/j		Agrégation anormale de cellules de Leydig, gonocytes multinucléés, baisse du taux de testostérone testiculaire	Mahood <i>et al.</i> , 2007

5.3. Cohérence Homme-animal et mécanisme d'action

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

Chez l'Homme, 3 études épidémiologiques portent sur les perturbations du développement *via* l'exposition maternelle au DnBP (Swan *et al.*, 2005 ; Marsee *et al.*, 2006 ; Huang *et al.*, 2009). Les résultats montrent clairement des effets sur les organes sexuels des nouveau-nés (garçon : réduction de la distance anogénitale, trouble de la migration testiculaire, hypoplasie scrotale et diminution de la taille de la verge ; filles : réduction de la distance anaogénitale), identiques à ceux retrouvés dans les études expérimentales animales. De même, plusieurs études épidémiologiques montrent une relation entre une altération de la qualité spermatique et/ou diminution des taux de testostérone et l'exposition au DnBP (Murature, 1987 ; Zhang *et al.*, 2006 ; Pan *et al.*, 2006 ; Hauser *et al.*, 2006 ; Pant *et al.*, 2008).

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

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

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

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

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

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

Ainsi, dans le cadre de la construction d'une VLEP pour le DnBP, il paraît pertinent d'employer les données relatives à l'espèce animale la plus sensible, à savoir le rat mâle, durant la période qui paraît la plus sensible, l'exposition *in utero*. Les effets sur le développement au niveau de l'appareil reproducteur mâle interviennent à la fois au niveau histologique et fonctionnel. Une énumération non exhaustive rapporte des lésions testiculaires (troubles de la migration, lésions dégénératives des tubes séminifères, diminution des spermatocytes, hyperplasie des cellules interstitielles, voire adénomes), des lésions de l'épididyme, des vésicules séminales, de la prostate, une diminution de la distance ano-génitale, l'augmentation du taux d'hypospadias, et enfin des persistances des mamelons. Le marqueur le plus sensible de ces effets semble être la mesure de la distance anogénitale. Ce paramètre est facilement identifiable et mesurable chez l'Homme comme chez l'animal. Il pourrait donc constituer un lien entre les études toxicologiques et les études épidémiologiques.

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

6. Construction des VLEP et recommandations

L'exposition au DnBP en milieu professionnel peut se faire soit par inhalation, soit par contact cutané (CE, 2003). La dose interne dépend du niveau d'exposition externe ainsi que du pourcentage d'absorption par inhalation ou par la peau.

La Commission MAK (DGF) est l'organisme qui recommande actuellement la VLEP la plus basse à savoir une VLEP-8h de $0,58 \text{ mg.m}^{-3}$. Cette valeur est basée sur l'étude de 28 jours non publiée de Gamer *et al.*, 2000 (rapport confidentiel BASF) (concentrations : de 0 – 1,18 – 5,57 – 49,3 ou 509 mg.m^{-3}). Il n'a pas été constaté d'effet systémique; toutefois, à toutes les concentrations, des lésions histologiques (hyperplasie au niveau de la cavité nasale et métaplasie « level I » du larynx) non inflammatoires des voies aériennes supérieures sont décrites. A partir d'un LOAEC de $1,18 \text{ mg.m}^{-3}$ pour les effets locaux respiratoires, la Commission MAK propose une VLEP provisoire de $0,58 \text{ mg.m}^{-3}$ qu'elle justifie par la présence d'effets peu prononcés à la concentration de $1,18 \text{ mg.m}^{-3}$ et d'une relation dose-réponse « plate ». Il est à noter que la démarche permettant le calcul de la VLEP à partir du LOAEC n'est pas décrite dans le document.

Par ailleurs, il est indiqué dans ce rapport qu'aucun NOAEL relatif à une toxicité systémique ne peut être déduit. Un LOAEL de 31 mg/kg/j a été identifié pour l'effet systémique le plus sensible soit l'altération de la morphologie des spermatozoïdes chez le rat (Mitsubishi *et al.*, 2004). Sur la base de ces résultats, une BMDL de $1,5 \text{ mg/kg/j}$ a été calculée puis extrapolé à une concentration inhalée chez les travailleurs de 10 mg.m^{-3} ($1,5 / (10/70)$).

Concernant l'effet tératogène, un NOAEL de 50 mg/kg/j a été identifié à partir de l'étude de Mylchreest (2000). Ainsi à 100 mg/kg/j , une absence de régression des mamelons a été notée chez des rats mâles exposés in utero au DnBP. L'extrapolation du NOAEL à une concentration inhalée par le travailleur selon le même calcul conduit à une valeur de 350 mg.m^{-3} .

Par conséquent la Commission MAK conclut que la recommandation d'une VLEP-8h de $0,58 \text{ mg.m}^{-3}$ protégerait le travailleur à la fois des effets systémiques et tératogènes induit par le DnBP.

6.1. Valeur Limite d'Exposition-8h

Choix de l'effet critique et de l'étude correspondante

Pour pouvoir construire la VLEP du DnBP, une analyse complète des données toxicologiques et des relations doses-effets issues d'une bibliographie étendue a été effectuée. Un effort particulier pour documenter et classer les différents effets sanitaires du DnBP à partir principalement de données animales (les études épidémiologiques étant quasi inexistantes) a permis de retenir comme effet critique la toxicité sur la reproduction.

La notion d'effets toxiques sur la reproduction a été considérée dans le sens de l'annexe VI de la Directive 69/548/CEE modifiée ; il s'agit des effets néfastes (ou nocifs) qui comprennent les altérations des fonctions et/ou de la capacité de reproduction chez l'homme ou chez la femme ainsi que les effets néfastes non héréditaires sur la descendance (plus souvent définis comme les effets sur le développement embryofœtal). Plus précisément, il s'agit, pour les effets sur la fertilité masculine et féminine: des effets néfastes sur la libido, sur le comportement sexuel, sur les différents aspects de la spermatogenèse ou de l'ovogenèse, sur l'activité hormonale ou sur la réponse physiologique qui perturberait la capacité de fécondation, sur la fécondation et sur le développement, de l'ovule fécondé jusqu'à l'implantation (CE, 2001).

Les études montrant un effet toxique sur la reproduction chez des animaux mâles ou femelles ou leur descendance ont été sélectionnées. Les études ont été retenues selon les critères suivants :

- Cohérence animal/homme de l'effet considéré,
- Sensibilité de l'effet, seules les études objectivant la plus basse dose repère (NOAEL ou LOAEL) ont été retenues
- Plausibilité du scénario d'exposition au regard de l'exposition professionnelle

Les résultats des études expérimentales montrent que les effets les plus sensibles sont observés sur le développement de l'appareil reproducteur mâle en lien avec une activité anti-androgénique du DnBP.

Les études expérimentales chez les rongeurs montrent des effets sur le développement et la fonction testiculaire suite à une exposition *in utero* qui ne sont pas retrouvés dans une étude chez le primate de McKinell *et al.* (McKinell *et al.*, 2009). Dans l'ensemble, il est probable que la meilleure connaissance du développement testiculaire du rat facilite la mise en évidence de manière détaillée des effets des phtalates car ceux-ci sont étroitement dépendants du stade de développement (Inserm, 2011).

L'effet critique retenu parmi l'ensemble des effets sur l'appareil reproducteur mâle attendus est la diminution de la concentration de testostérone testiculaire chez le fœtus à partir de l'étude de Lehmann (2004). Parmi les études expérimentales chez l'animal sur les effets reprotoxiques du DnBP, cette étude est celle objectivant le NOAEL le plus bas et présente l'effet le plus sensible. D'après les données de la littérature, la différenciation des testicules a lieu au 14,5^{ème} jour de gestation chez le rat et au 43^{ème} jour chez l'homme (Shepard, 1998). Or, pendant le premier tiers de la grossesse, la femme enceinte est susceptible d'être exposée professionnellement au DnBP. Par conséquent les effets du DnBP sur le développement fœtal ne peuvent être écartés pour la construction de valeur limite en milieu professionnel.

Par conséquent cette étude est retenue pour la construction de la VLEP. Dans cette étude des rats Sprague Dawley gravides ont été exposées par gavage au DnBP (doses de 0,1- 1- 10-50-100-500 mg/kg/j) du 12^{ème} au 19^{ème} jour de gestation.

Le NOAEL identifié est de 10 mg/kg/j.

Les avantages et les limites de cette étude sont :

Avantages :

Il est proposé de classer cette étude «2e » selon la cotation de Klimish. L'effet critique retenu est spécifique au DnBP. En effet, l'appareil reproducteur de la progéniture mâle semble l'organe cible principal de la toxicité du DnBP chez l'animal, particulièrement sensible au cours du développement.

Limites :

- Les animaux ont été exposés par voie orale (gavage) alors que la voie d'exposition prépondérante des travailleurs à cette substance est l'inhalation.
- Seule la fonction testiculaire a été investiguée dans cette étude.

Chez les rongeurs, l'absorption gastro-intestinale du DnBP est proche de 100% (Inserm, 2011). En l'absence de donnée, il est considéré par défaut que l'absorption par inhalation chez le rongeur est de 100%. En l'absence d'autre données, le CES considère par défaut que ces pourcentages d'absorption sont les mêmes chez l'Homme.

Selon ECHA (2012b), le volume respiratoire d'un rat pour une exposition de 8h (exprimé par kilogramme de poids corporel) est de 0,38 m³.kg⁻¹. Il correspond au volume respiratoire « standard » de 6,7 m³ chez un homme de 70 Kg. Pour rappel, le volume respiratoire d'un travailleur est estimé à 10 m³.

On obtient :

$$NOAEL_{\text{inhalé estimé}} (\text{mg.m}^{-3}) = NOAEL_{\text{voie orale rat}} \times \frac{1}{0,38} \times \frac{6,7}{10}$$

L'application de ce calcul aux données issues de l'étude de Lehmann (2004) conduit à un NOAEL équivalent, chez le travailleur, par inhalation de 17,6 mg.m⁻³.

Choix des facteurs d'ajustement

Il est proposé d'appliquer les facteurs de sécurité suivants :

- FS_A (variabilité inter-espèce) : 3 justifié par l'ajustement allométrique qui permet de s'affranchir de la composante cinétique. L'Inserm sur la base d'une revue complète de la littérature conclut que l'on ne dispose pas de données suffisantes pour affirmer que l'homme est plus sensible que le rat ou l'inverse. Les études sur primates non humains ne sont pas suffisantes pour juger de la pertinence du modèle animal et les effets observés rongeurs sont à prendre en compte.
- FS_H (variabilité inter-individuelle) : 3. En l'absence de données quantifiée sur la variabilité inter-individuelle, la valeur de 3 est attribuée par défaut à ce facteur

Bien que la voie d'exposition ne soit pas la plus adaptée pour la construction de VLEP, l'application d'un facteur d'ajustement pour l'extrapolation voie à voie n'est pas nécessaire, en effet:

-s'agissant d'un effet systémique, les calculs ont été effectués selon un scénario qui considère que l'absorption par voie orale aussi bien que par inhalation est égale à 100%

-le NOAEL a été recalculé pour être adapté au volume pulmonaire du rat et sur la durée de travail du travailleur.

Valeur de VLEP-8H

Effet critique	Dose critique	FS	VLEP-8h
Diminution de la concentration de testostérone fœtale	<p>NOAEL = 10 mg.kg⁻¹.j⁻¹ <u>Extrapolation voie à voie</u> NOAEL_{HEC}inhalé = 17,6 mg. m⁻³</p>	<p>9 FS_A 3 FS_H 3</p>	<p>1,95 mg.m⁻³ arrondi pour recommander une VLEP-8h de 2 mg.m⁻³</p>

La VLEP proposée est de 2 mg.m⁻³. Cette valeur vise à protéger des effets sur le développement fœtal de l'appareil reproducteur mâle en lien avec une activité anti-androgénique du DnBP lors d'exposition *in utero* (atteintes testiculaires notamment). Par ailleurs cette valeur est également protectrice pour l'ensemble des autres effets sur la population générale des travailleurs.

6.2. Valeur Limite Court terme-15 minutes

Chez l'Homme, aucune donnée sur l'irritation induite après une exposition au DnBP n'a été recensée dans la littérature.

Chez l'animal et par inhalation, l'étude de Gamer 2000 (cité par CE, 2003 et ECHA, 2012a) décrit des effets locaux respiratoires sans que ne leurs soient associés une inflammation. De ce fait le RAR considère que l'irritation n'est pas transposable au travailleur.

En l'absence de données, il est proposé de ne pas dépasser sur 15 minutes la valeur de 5 fois la VLEP-8h lors de toute exposition professionnelle au DnBP soit 10 mg.m^{-3} .

6.3. Mention peau

L'étude *in vitro* de Scott *et al.*, 1987 rapporte une valeur du flux de perméation cutanée de $0,07 \mu\text{g.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ déterminé après application de DnBP non dilué sur de la peau humaine.

Conformément au document méthodologique du CES, l'application des critères ECETOC¹¹ pour déterminer un apport relatif par la voie cutanée par rapport à l'inhalation, à un niveau d'exposition correspondant à la VLEP-8H (2 mg.m^{-3}) donne une contribution de 0,7%. Par conséquent, le CES ne recommande pas l'attribution de la mention peau pour cette substance.

¹¹ La quantité de composé absorbé après exposition des mains et des avant-bras (2000 cm^2) pendant 1h doit contribuer à plus de 10 % de la dose systémique absorbée par inhalation sur 1 journée de travail de 8h à la VLEP-8h (ECETOC, 1993).

7. Conclusions

VLEP-8h = 2 mg.m⁻³

Pas de VLCT-15min proposée ;

Mais il est par ailleurs recommandé de ne pas dépasser sur 15 minutes une VLCT-15min pragmatique de 10 mg.m⁻³ correspondant à 5 fois la VLEP-8h recommandée ;

Pas d'attribution de la Mention « peau ».

8. Bibliographie

- Agarwal DK, Lawrence WH, Nunez LJ, Autian J (1985). Mutagenicity evaluation of phthalic acid esters and metabolites in *Salmonella typhimurium* cultures. *J. Toxicol. Environ. Health* 16, 61-69.
- Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Anses) (2010). Valeurs toxicologique de référence (VTR) : élaboration de VTR fondées sur des effets reprotoxiques. Rapport d'expertise collective. Edition scientifique air et agents chimiques (Maisons-Alfort, Afsset)
- Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Anses). (2014). Valeurs limites d'exposition en milieu professionnel – Document de référence. (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, France). 122 p.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2001). Toxicological profile for Di-n-butyl phthalate. U.S Department and of Health and human services (ATSDR, Atlanta).
- Alam MS, Ohsako S, Matsuwaki T, Zhu XB, Tsunekawa N, Kanai Y, Sonz H, Tohyama C, Kurohmaru M (2010) Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: a possible estrogenic effect of di (n-butyl) phthalate. *Reproduction* 139 (2) : 427 - 437.
- Auharek SA, De Franca LR, Mckinnell C, Jobling MS, Scott HM, Sharpe RM (2010). Prenatal plus postnatal exposure to Di(n-Butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final sertoli cell number in the rat. *Endocrinology*, 151 : 2868-2875
- Boekelheide K, Kleymenova E, Liu K, Swanson C, Gaido KW (2009). Dose-dependent effects on cell proliferation, seminiferous tubules, and male germ cells in the fetal rat testis following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Microsc Res Tech*, 72 : 629-638
- Borch J, Dalgaard M, Ladefoged O (2005). Early testicular effects in rats perinatally exposed to DEHP in combination with DEHA-apoptosis assessment and immunohistochemical studies. *Reprod Toxicol*, 19 : 517-525
- Bronaugh RL, Stewart RF, Congdon ER, Giles AL (1982). Methods for in vitro percutaneous absorption studies. I. Comparison with in vivo results. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 62, 476-480.
- Bredhult C, Backlin BM, Olovsson M (2007). Effects of some endocrine disruptors on the proliferation and viability of human endometrial endothelial cells in vitro. *Reprod Toxicol* 23(4); 550-559.
- BUA (1987). German Chemical Society. GDCh-Advisory Committee on Existing Chemicals of Environmental Relevance. Dibutylphthalate, BUA-Report 22, December 1987.
- Calnan CD (1975). Dibutyl phthalate. *Dermatitis* 11, 388.
- Canadian Environmental Protection Act (EPA) (1994). Priority Substances List. Assessment report: Dibutyl phthalate. Ottawa, Ontario, Environment Canada and Health Canada.
- Clewell RA, Kremer JJ, Williams CC, Campbell JL Jr, Andersen ME, Borghoff SJ (2008). Tissue exposures to free and glucuronidated monobutylphthalate in the pregnant and fetal rat following exposure to di-n-butylphthalate: evaluation with a PBPK model. *Toxicol Sci*, 103 (2), 241-259
- Commission européenne (CE) Joint Research Centre - Institute for Health and Consumers Protection European Chemicals Bureau (ECB). (2003) European Union Risk Assessment Report: Dibutyl phthalate. Volume 29. (Luxembourg : Office for official publications of the European Communities L – 2985) Consultable sur le site : <http://ecb.jrc.it/existing-chemicals>.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). The MAK Collection for Occupational Health and Safety. Di-n-butyl phthalate (2013). Disponible sur <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.mb8474yole4813/pdf>
- Directive 2001/59/CE de la Commission du 6 août 2001 portant vingt-huitième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses. *Journal Officiel des Communautés Européennes*.
- Drake AJ, Van Den Driesche S, Scott HM, Hutchison GR, Seckl JR, et al (2009). Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development *Endocrinology*, 150 : 5055-5064

- Duty SM, Calafat AM, Silva MJ, Ryan L, Hauser R (2005). Phthalate exposure and reproductive hormones in adult men. *Human Reprod.*, 20(3):604-10
- European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) (1993) Technical document N° 31 (Revised), Strategy for assigning a "skin notation".
- European Chemical Agency (ECHA) (2012a). ECHA Chem Database, registered substances. Dibutyl phthalate. Disponible sur le site internet <http://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/registered-substances>. Consulté le 16/02/2012
- European Chemicals Agency (ECHA) (2012b) Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.8: Characterisation of dose [concentration]-response for human health. Disponible sur : http://echa.europa.eu/documents/10162/17224/information_requirements_r8_en.pdf
- Elsisi AE, Carter DE, Sipes IG (1989). Dermal absorption of phthalate diester in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12,70-77.
- Ema M, Miyawaki E (2001). Adverse effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given monobutyl phthalate, a metabolite of dibutyl phthalate, during late pregnancy. *Reprod Toxicol*, 15 : 189-194
- Ferrara D, Hallmark N, Scott H, Brown R, McKinnell C, Mahood IK, Sharpe RM (2006). Acute and long-term effects of *in utero* exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology* 147(11); 5352-5362.
- Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM (2003). Human testicular dysgenesis syndrome : a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod*, 18 : 1383-1394
- Florin I, Rutberg L, Curvall M, Enzell CR(1979). Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames test. *Toxicology* 15, 219-232.
- Foster PM, Cook MW, Thomas LV, Walters DG, Gangolli SD (1982). Differences in urinary metabolic profile from di-n-butylphthalate-treated rats and hamsters. A Possible Explanation for Species Differences in Susceptibility to Testicular Atrophy. *Drug Metabol. Disp.* 11(1), 59-61.
- Gaido KW, Hensley JB, Liu D, Wallace DG, Borghoff S, Johnson KJ, Hall SJ, Boekelheide K (2007). Fetal mouse phthalate exposure shows that Gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci* 97(2); 491-503.
- Gilioli R (1978). Horizontal and longitudinal study of a population employed in the production of phthalates. *Med. Lav.* 69, 620-631. In: IPCS (1997) International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 189. Di-n-butyl Phthalate. World Health Organization, Geneva. pp. 130-131.
- Gray LE Jr, Laskey J, Ostby J (2006). Chronic di-n-butyl phthalate exposure in rats reduces fertility and alters ovarian function during pregnancy in female Long Evans hooded rats. *Toxicol Sci* 93(1); 189-195.
- Hauser R, Meeker JD, Duty S, Silva MJ, Calafat AM (2006). Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Epidemiology*;17(6):682-91.
- Howdeshell KL, Furr J, Lambright CR, Rider CV, Wilson VS, et al (2007). Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development : altered fetal steroid hormones and genes. *Toxicol Sci*, 99 : 190-202
- Howdeshell KL, Wilson VS, Furr J, Lambright CR, Rider CV, Blystone CR, et al. A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicol Sci.* 2008;105(1):153-65. Epub 2008 Apr 14.
- Huang PC, Kuo PL, Guo YL, Liao PC, Lee CC (2007). Associations between urinary phthalate monoesters and thyroid hormones in pregnant women. *Hum Reprod.*,22(10):2715-22. Epub 2007 Aug 17.
- Huang PC, Kuo PL, Chou YY, Lin SJ, Lee CC (2009). Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environ Int*,18:18.
- Husain SL (1975). Dibutyl phthalate sensitivity. Contact Dermatitis 1, 395. In: IPCS (1997) International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 189. Di-n-butyl Phthalate. World Health Organization, Geneva. p.129.
- IPCS/WHO (1997). Di-n-butylphthalate. Environmental Health Criteria 189. IPCS/WHO.
- Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) (2011) Reproduction et environnement. Expertise collective (Paris, Inserm)

- Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) (2003). phtalate de dibutyle – Fiche toxicologique n° 98. Cahier des notes documentaires – Hygiène et sécurité du travail – N°192, 3e trimestre (Paris, INRS).
- Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) (2006). Phtalate de dibutyle. Fiche DEMETER (document pour l'évaluation médicale des des produits toxiques vis-à-vis de la reproduction) N° DEM 005 (Paris, INRS).
- IPCS/WHO (1997). Di-n-butylphthalate. Environmental Health Criteria 189. IPCS/WHO
- Itoh H, Iwasaki M, Hanaoka T, Sasaki H, Tanaka T, et al (2009). Urinary phthalate monoesters and endometriosis in infertile Japanese women. *Sci Total Environ*, 408 : 37-42
- Jaakkola JJ, Verkasalo PK, Jaakkola N (2000). Plastic wall materials in the home and respiratory health in young children. *Am J Public Health*,90(5):797-9.
- Jaakkola JJ, Parise H, Kislitsin V, Lebedeva NI, Spengler JD (2004). Asthma, wheezing, and allergies in Russian schoolchildren in relation to new surface materials in the home. *Am J Public Health*.;94(4):560-2.
- Jaakkola JJ, Ieromnimon A, Jaakkola MS (2006). Interior surface materials and asthma in adults: a population-based incident case-control study. *Am J Epidemiol*.;164(8):742-9. Epub 2006 Jul 28.
- Jaakkola JJ, Knight TL (2008). The role of exposure to phthalates from polyvinyl chloride products in the development of asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*. 116(7):845-53.
- Janjua NR, Mortensen GK, Andersson AM, Kongshoj B, Skakkebaek NE, Wulf HC (2007). Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. *Environ Sci Technol*.;41(15):5564-70.
- Johson KJ, Mccahan SM, Si X, Campion L, Herrmann R, et al (2008). The orl rat with inherited cryptorchidism has increased susceptibility to the testicular effects of *in utero* dibutyl phthalate exposure. *Toxicol Sci*, 105 : 360-367
- Kawano M (1980). Toxicological studies on phthalate esters. I: Inhalation effects of dibutylphthalate (DBP) on rats. *Jap. J. Hyg.* 35, 684-692.
- Lake BG,Phillips JC, Linnell JC, Gangolli SD (1977). The *in vitro* hydrolysis of some phthalate diesters by hepatic and intestinal preparations from various species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39 (2), 239-248.
- Lamb JC 4th , Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR (1987). Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 88, 255-269.
- Lapinskas PJ, Brown S, Leesnitzer LM, Blanchard S, Swanson C, Cattley RC, Corton JC (2005). Role of PPARalpha in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology* 207(1); 149-163.
- Lee BM, Koo HJ. Hershberger assay for antiandrogenic effects of phthalates. *J Toxicol Environ Health A*. 2007;70(15-16):1365-70.
- Lee E, Kim HJ, Im JY, Kim J, Park H, Ryu JY, Lee J, Shim KA, Jung KK, Han SY, Lee BM, Kim SH, Kim HS (2008). Hypothyroidism protects di(n-butyl) phthalate-induced reproductive organs damage in Sprague-Dawley male rats. *J. Toxicol. Sci.* 33 (3): 299-306.
- Lee KY, Shibutani M, Tagagi H, Kato N, Tagigami S, Uneyama C, Hirose M (2004). Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology*, 203, 221-258.
- Lehman AJ (1955). Insect repellents. *Quart. Bull. Food Drug Off. US* 19, 87-99.
- Lehmann KP, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW (2004). Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 81(1); 60-68.
- Lehmann KP, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW (2004). Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci*.;81(1):60-8. Epub 2004 May 12.
- Lu KY, Tseng FW, Wu CJ, Liu PS (2004). Suppression by phthalates of the calcium signaling of human nicotinic acetylcholine receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicology* 200(2-3); 113-121.
- Macleod DJ, Sharpe RM, Welsh M, Fiskens M, Scott HM, et al (2010). Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *Int J Androl*, 33 : 279-287

- Mahood IK, Scott HM, Brown R, Hallmark N, Walker M, Sharpe RM (2007). *In utero* exposure to di(n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1; 55-61.
- Martino-Andrade AJ, Morais RN, Botelho GG, Muller G, Grande SW, et al (2009). Coadministration of active phthalates results in disruption of foetal testicular function in rats. *Int J Androl* 2009, 32 : 704-712
- Marsee K, Woodruff TJ, Axelrad DA, Calafat AM, Swan SH (2006). Estimated daily phthalate exposure in a population of mothers of male exhibiting reduced anogenital distance. *Environ. Health Perspect.* 114 (6), 805-809.
- McKee RH, Butala JH, Raymond MD, Gerhard G (2004). NTP Center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates addressing the data gaps. *Reproductive Toxicology*, 16, 1-22.
- Mckinnell C, Mlitchell RT, Walker M, Morris K, Kelnar CJ, et al (2009). Effect of fetal or neonatal exposure to monobutyl phthalate (MBP) on testicular development and function in the marmoset. *Hum Reprod*, 24 : 2244-2254
- Milkov LE, Aldyreva MV, Popova TB, Lopukhova KA, Makarenko YL, Malyar LM, Sharkhova TK (1973). Health status of workers exposed to phthalate plasticizers in the manufacture of artificial leather and films based on PVC resins. *Environ. Health Perspect.* 3, 175-178.
- Mitsuhashi M, Morimura K, Wanibuchi H, Hayashi S, Kiyota A, Wada S, Nakatani T, Fukushima S. Di-n-butyl phthalate is toxic to the male reproductive system and its toxicity is enhanced by thioacetamide induced liver injury. *J Toxicol Pathol* 2004; 17: 177-185.
- Morrissey RE, Lamb JC 4th, Morris RW, Chapin RE, Gulati DK, Heindel JJ (1989). Results and evaluation of 48 continuous breeding reproduction studies conducted in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 13, 747-777.
- Murature DA, Tang SY, Steinhardt G, Dougherty RC (1987). Phthalate esters and semen quality parameters. *Biomed Environ Mass Spectrom.* 14:473-477.
- Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC, Foster PMD (2000). Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol. Sci.*, 55, 143-151.
- Mylchreest E et al. (1999). Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-Butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156, 81-95.
- Mylchreest E et al. (1998). Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol. Sci.* 43, 47-60.
- Nair N, Bedwal S, Kumari D, Bedwal S, Bedwal RS (2008). Effect on histological and sperm kinetics in DBP exposed Wistar rats. *J Environ Biol*, 29 : 769-772
- Nikonorow M, Mazur H, Piekacz H(1973). Effect of orally administered plasticizers and polyvinyl chloride stabilizers in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 26 (2), 253-259.
- National Toxicology Program (NTP) (1995). Toxicity Report Series Number 30. by DS Marsman. NTP Technical Report on toxicity studies of dibutyl phthalate (CAS No. 84-74-2). Administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. NIH Publication 95-3353. US Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Institutes of Health. Dated April 1995.
- National Toxicology Program (NTP) (2000). NTP-CERHR expert panel report on dinbutyl phthalate. Alexandria, VA: Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program. NTP-CERHR-DBP-00.
- Oliwiecki S et al. (1991). Contact dermatitis from spectacle frames and hearing aid containing diethylphthalate. *Contact Dermatitis* 25, 264-265.
- Omori Y (1976). Recent progress in safety evaluation studies on plasticizers and plastics and their controlled use in Japan. *Environ. Health Perspect.* 17, 203-209.
- Pan G, Hanaoka T, Yoshimura M, Zhang S, Wang P, Tsukino H, Inoue K, Nakazawa H, Tsugane S, Takahashi K (2006). Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): a cross-sectional study in China. *Environ Health Perspect* 114(11); 1643-1648.
- Pant N, Shukla M, Patel DK, Shukla Y, Mathur N, Gupta NK, Saxena DK (2008). Correlation of phtalates exposures with semen quality. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 231(1), 112-116.

- Parveen M, Inoue A, Ise R, Tanji M, Kiyama R (2008). Evaluation of estrogenic activity of phthalate esters by gene expression profiling using a focused microarray (EstrArray). *Environ Toxicol Chem.* 27(6):1416-25. Epub 2008 Feb 9.
- RIVM (1991). Update of the exploratory report phthalates. Report no 7104010 08. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, May 1991.
- Rowland IR, Cottrell RC, Phillips JC (1977). Hydrolysis of phthalate esters by the gastro-intestinal contents of the rat. *Food Cosm. Toxicol.* 15 (1), 17-21.
- Ryu JY, Lee BM, Kacew S, Kim HS (2007) Identification of differentially expressed genes in the testis of Sprague-Dawley rats treated with di(n-butyl) phthalate. *Toxicology* 234(1-2): 103-12
- Ryu JY, Lee E, Kim TH, Lee YJ, Lee J, Lee BM, Kwack SJ, Jung KK, Han SY, Kim SH, Kacew S, Kim HS (2008). Time-response effects of testicular gene expression profiles in Sprague-Dawley male rats treated with di(n-butyl) phthalate. *J Toxicol Environ Health A* 71(23); 1542-1549.
- Saillenfait AM, Payan JP, Fabry JP, Beydon D, Langonne I, Gallissot F, Sabate JP (1998). Assessment of the developmental toxicity, metabolism and placental transfer of Di-nbutyl phthalate administered to pregnant rats. *Toxicol. Sci.* 45(2), 212-224.
- Saint-Laurent L, Rhainds M (2004). Les phtalates : états des connaissances sur la toxicité et l'exposition de la population générale. Communiqué de veille toxicologique. Institut national de santé publique Québec.
- Scott RC, Dugard PH, Ramsey JD, Rhodes C. (1987). In vitro absorption of some o-phthalate diesters through human and rat skin. *Environ. Health Perspect.* 74, 223-227.
- Scott HM, Hutchison GR, Jobling MS, Mckinell C, Drake AJ, et al (2008). Relationship between androgen action in the "male programming window," fetal Sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinology*, 149 : 5280-5287
- Seckin E, Fromme H, Völkel W (2009). Determination of total and free mono-n-butyl phthalate in human urine samples after medication of a di-n-butyl phthalate containing capsule. *Toxicology Letters* 188; 33-37.
- Seed JL (1982). Mutagenic activity of phthalate esters in bacterial liquid suspension assays. *Environ. Health Perspect.* 45, 111-114.
- Shahin MM, Von Borstel RC (1977). Mutagenic and lethal effects of α -benzene hexachloride, dibutyl phthalate and trichloro ethylene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 48, 173-180.
- Sharpe RM (2005). Phthalate exposure during pregnancy and lower anogenital index in boys: wider implications for the general population. *Environ. Health Perspect.*, 113, A 504-A 505.
- Shepard TH (1998). Catalog of teratogenic agents, 9th ed. Baltimore : The Johns Hopkins University Press.
- Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Malek NA, Hodge CC, Caudill SP, Brock JW, Needham LL, Calafat AM (2004). Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environ Health Perspect.* 112 (3), 331-338.
- Silva MJ, Samandar E, Reidy JA, Hauser R, Needham LL, Calafat AM (2007). Metabolite profiles of di-n-butyl phthalate in humans and rats. *Environ. Sci. Technol.* 41 (21), 7576-7580.
- Smith CC (1953). Toxicity of butylstearate, dibutylsebacate, dibutylphthalate and methoxyethylolate. *Arch. Hyg. Occup. Med.* 7, 310-318.
- Sneddon IB (1972). Dermatitis from dibutyl phthalate in an aerosol antiperspirant and deodorant. *Contact Dermatitis Newsletter* 12, 308.
- Srivastava SP, Srivastava S, Saxena DK, Chandra SV, Seth PK (1990a). Testicular effects of di-n-butyl phthalate (DBP) : biochemical and histopathological alterations. *Archives of Toxicology*, 64, 148-152.
- Srivastava S, Singh GB, Srivastava SP, Seth PK (1990b). Testicular toxicity of di-n-butyl phthalate in adult rats. Effect on marker enzymes of spermatogenesis. *J. of Exp. Biol.*, 28, 67-70.
- Struve MF, Gaido KW, Hensley, Lehmann KP, Ross SM, et al (2009). Reproductive toxicity and pharmacokinetics of di-n-butyl phthalate (DBP) following dietary exposure of pregnant rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 86 : 345-354
- Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, Mao CS, Redmon JB, Ternand CL, Sullivan S, Teague JL. The Study for Future Families Research Team. (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ. Health Perspect.*, 113, 1056-1061.

- Swan SH (2008). Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res*, 108 : 177-184
- Tanaka A, Matsumoto A, Yamaha T (1978). Biochemical studies on phthalic esters. III. Metabolism of dibutyl phthalate (DBP) in animals. *Toxicology* 9 (1-2), 109-123
- Walseth F, Nilson OG (1984). Phthalate esters. II. Effects of inhaled dibutylphthalate on cytochrome P-450 mediated metabolism in rat liver and lung. *Arch. Toxicol.* 55 (2), 132-136. Wang Y, Song L, Chen J, He J, Liu R, Zhu Z, Wang X (2004a). Effects of di-butyl phthalate on sperm motility and oxidative stress in rats. *Zhonghua Nan Ke Xue* 10(4); 253-236.
- White RD, Carter DE, Earnest D, Mueller J (1980). Absorption and metabolism of three phthalate diesters by the rat small intestine. *Food Cosmet. Toxicol.* 18 (4), 383-386.
- Williams DF, Blanchfield BJ (1975). The retention, distribution, excretion and metabolism of dibutyl phthalate-7-14C in the rat. *J. Agric. Food Chem.* 23(5), 854-858.
- Wine R.N., Li L.H., Barnes L.H., Gulati D.K., Chapin R.E. (1997). Reproductive toxicity of di-butylphthalate in a continuous breeding protocol in sprague-dawley rats. *Environmental Health Perspectives*, 105, 102-107.
- Wittassek M, Angerer J (2007). Phthalates : metabolism and exposure *Int J Androl* 2008, 31 (2), 131-138
- Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, Ostby J, Gray E Jr. (1999). Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexylphthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol. Ind. Health* 15(1-2), 94-118.
- Zhang Y, Chen B, Ding X, Jiang X (2004). Reproductive and developmental toxicity of F1 male rats treated with DBP *in utero* and during lactation. *Wei Sheng Yan Jiu* 33(1); 9-14.
- Zhang YH, Zheng LX, Chen BH. Phthalate exposure and human semen quality in Shanghai : a cross-sectional study. *Biomed Environ Sci* 2006, 19 : 205-209
- Zhang Y, Lin L, Cao Y, Chen B, Zheng L, et al. (2009). Phthalate Levels and Low Birth Weight : A Nested Case-Control Study of Chinese Newborns. *J Pediatr*, 155 : 500-504
- Zeiger E et al. (1985). Mutagenicity testing of di(2-ethylhexyl)phthalate and related chemicals in *Salmonella*. *Environ. Mutagen.* 7, 213-232.
- Zimmermann FK, von Borstel RC, von Halle ES, Parry JM, Siebert D, Zetterberg, Barale R, Loprieno N (1984). Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the US Environmental Protection Agency. *Gene-Tox Program. Mutat. Res.* 133, 199-244.

Partie B – Rapport d'évaluation des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur les lieux de travail

1. Utilisations professionnelles

Le di-n-butyl-phtalate est produit par la réaction de l'anhydride phtalique, n butanol en présence d'acide sulfurique concentré comme catalyseur. L'excès d'alcool est récupéré et recyclé et le di-n-butyl-phtalate est purifié par distillation sous vide et sur charbon actif activé.

Il est utilisé principalement comme agent plastifiant.

2. Présentation et discussion des méthodes de mesure du DnBP dans l'air des lieux de travail

2.1. Recensement et classement des méthodes de mesure

Les méthodes de mesure de la concentration d'une substance dans l'air des lieux de travail sont évaluées de manière à recommander une ou plusieurs méthodes de référence permettant d'effectuer des mesures de concentration de la substance à des fins de comparaison avec les valeurs limites d'exposition professionnelle établies par le CES VLEP.

L'objectif n'est pas de classer l'ensemble des méthodes selon un système de notation chiffrée mais plutôt de présenter de manière structurée et systématique les critères permettant d'arriver à un choix final fondé sur un jugement scientifique.

- Catégorie 1A : méthodes reconnues et validées
- Catégorie 1B : méthodes partiellement validées
- Catégorie 2 : méthodes indicatives (des critères essentiels de validation ne sont pas suffisamment explicités).
- Catégorie 3 : méthode non adaptée, des critères essentiels de validation sont absents ou inappropriés

Le tableau suivant présente les méthodes et protocoles de mesure de la concentration en DnBP dans l'air des lieux de travail.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des méthodes de mesurage du DnBP dans l'air des lieux de travail

N°	Méthodes	Protocoles	Catégorie		
			Contrôle technique de la VLEP-8h	Contrôle technique de la VLCT-15min	Suivi des expositions court terme
1	Prélèvement sur tube de mousse polyuréthane - Désorption dans du toluène - Analyse par chromatographie en phase gazeuse (détecteur FID ou CE)	MétroPol : fiche 96 : 2006	3		
2	Prélèvement sur tube OVS - Désorption dans du toluène - Analyse par chromatographie en phase gazeuse (détecteur FID)	OSHA 104 : 1994	1B <i>Si présence uniquement phase gazeuse uniquement</i>		
3	Prélèvement sur membrane en ester de cellulose - Désorption dans CS ₂ - Analyse par chromatographie en phase gazeuse (détecteur FID)	NIOSH NMAM 5020, issue 2 : 1994	3	1B	
			<i>Si présence phase aérosol uniquement</i>		
4	Prélèvement sur filtre nitrate de cellulose - Désorption dans un mélange eau/acétonitrile - Analyse par	IRSST : méthode 308.-1	3		

	chromatographie en phase liquide (détecteur UV)			
5	Prélèvement sur filtre en acétate de cellulose et tube de gel de silice - Désorption dans le méthanol - Analyse par chromatographie en phase liquide (détecteur UV)	DFG méthode 2 :2006 et IFA : méthode 8387 : 2009	2	1B
<i>Si présence phase mixte ou aérosol</i>				

Le graphique ci-dessous présente le domaine, pour lesquelles les différentes méthodes ont été testées, ainsi que leur limite de quantification au regard de la VLEP-8h recommandée par le CES VLEP.

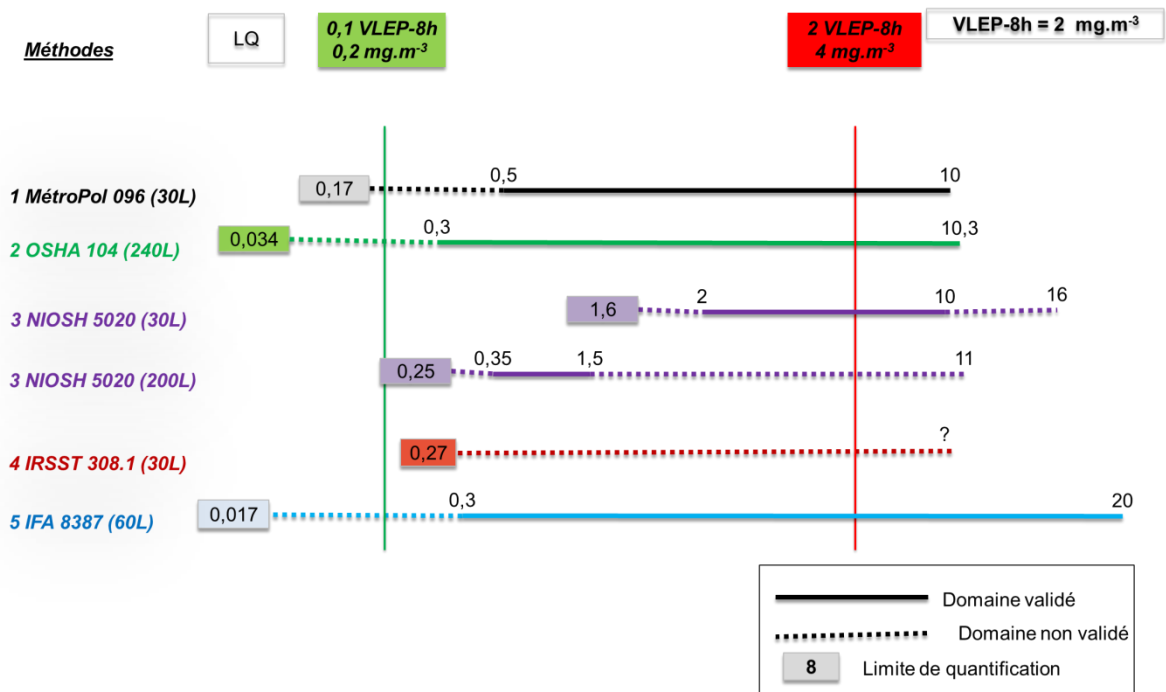


Figure 4 : Domaine de validité et limite de quantification des différentes méthodes comparés au domaine 0,1 à 2 VLEP-8h recommandée par le CES VLEP pour le DnBP

Le graphique ci-dessous présente le domaine, pour lesquelles les différentes méthodes ont été testées, ainsi que leur limite de quantification au regard de la VLCT-15min pragmatique recommandée par le CES VLEP.

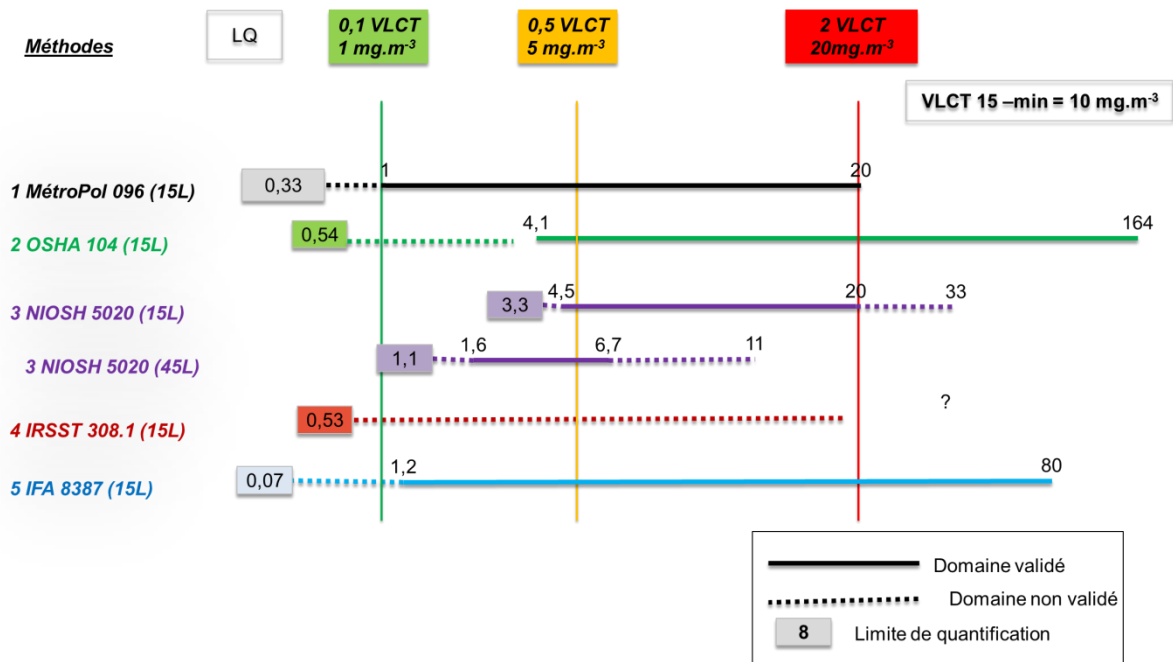


Figure 5 : Domaine de validité et limite de quantification des différentes méthodes comparés au domaine 0,1 à 2 VLCT-15min pragmatique recommandée par le CES VLEP pour le DnBP

2.2. Discussion des méthodes de mesure

2.2.1 Évaluation détaillée des méthodes classées en catégorie 1B et 2

2.2.1.1 Méthode 2 : prélèvement actif sur tube OVS – désorption dans le toluène – analyse par GC/FID

La méthode, décrite dans le protocole OSHA 104, consiste à effectuer un prélèvement par pompage au travers d'un tube OVS, comprenant un préfiltre en fibre de verre suivi de deux pages de ténax (140 /70 mg de ténax), puis à effectuer une extraction au toluène et enfin à réaliser un dosage par chromatographie en phase gazeuse avec une détection en ionisation de flamme.

Le dispositif de prélèvement (nature du support, géométrie du tube) est bien décrit.

Le débit est fixé à 1 L.min⁻¹. La méthode recommande de ne pas dépasser un volume de 240 L, soit un prélèvement de 4 h maximum.

La méthode pourrait convenir pour prélever une phase mixte constituée d'un aérosol et de la phase gazeuse du composé. Néanmoins, la géométrie du tube, lequel est doté d'une ouverture de diamètre 13 mm ne permet pas de savoir quelle fraction de l'aérosol est effectivement prélevée.

Domaine de validation :

La méthode est validée entre :

- 0,3 mg.m⁻³ et 10,3 mg.m⁻³ pour un volume d'air prélevé de 240 L, soit entre 0,15 et 5 fois la VLEP-8h recommandée par le CES.
- 4,1 et 164,7 mg.m⁻³ pour un prélèvement d'air de 15 L, soit entre 0,4 et 16 fois la VLCT-15min recommandée par le CES.

Limite de détection :

La limite de détection est de 2,4 µg par échantillon, soit :

- 0,01 mg.m⁻³ pour un prélèvement d'air de 240 L.
- 0,16 mg.m⁻³ pour un prélèvement d'air de 15 L

Limite de quantification :

La limite de quantification déterminée selon la procédure de l'OSHA est de 8,1 µg par échantillon, soit :

- 0,034 mg.m⁻³ pour un prélèvement de 240 L, ce qui correspond à 0,02 fois la VLEP-8h recommandée par le CES
- 0,54 mg.m⁻³ pour un prélèvement de 15 L, ce qui correspond à 0,05 fois la VLCT-15min recommandée par le CES.

Efficacité de désorption :

Le coefficient de désorption a été déterminé par dopage du tube de ténax à des niveaux compris entre 61,8 µg et 2471 µg.

Dans ces conditions, le coefficient de désorption est compris entre 97,6 et 101,4%. Le coefficient de désorption déterminé est validé sur un domaine compris entre :

- 0,3 et 10,3 mg.m⁻³ pour un volume d'air prélevé de 240 L
- 4,1 et 164,7 mg.m⁻³ pour un volume d'air prélevé de 15 L

Taux de récupération :

Après conservation pendant 15 jours d'échantillons obtenus après prélèvement en atmosphère contrôlée, le taux de récupération est compris entre 96,4 et 99,1% pour une conservation à température ambiante et entre 98,4 et 106% pour une conservation au froid.

Capacité de piégeage/volume de claquage :

A partir d'une concentration générée au moyen d'un banc de génération dynamique pour une concentration de l'ordre de 8,8 mg.m⁻³ dans des conditions ambiantes contrôlées (80% d'humidité et à 25°C) le volume de claquage est supérieur à 300 L.

Linéarité du détecteur :

La linéarité de réponse du détecteur est vérifiée sur l'intervalle correspondant à 2,6 à 10,3 mg.m⁻³ (pour un volume d'air prélevé de 240L) ou à 41 à 164,7 mg.m⁻³ pour un volume d'air prélevé de 15 L.

Spécificité de la méthode :

La méthode n'est pas spécifique en ce qui concerne le prélèvement mais devient spécifique par le choix approprié de conditions chromatographiques permettant la séparation du di-n-butyl-phtalate d'autres composés interférents.

Conditions environnementales :

La méthode ne donne aucune information sur ce point.

Conservation des échantillons :

Les conditions optimales sont données dans l'étude du taux de récupération.

Domaine de mesure accessible :

Prenant en compte la limite de quantification de la méthode (8,1 µg) et le volume maximal d'air recommandé, la concentration minimale quantifiable est donc égale à 0,034 mg.m⁻³ soit 0,02 fois la VLEP recommandée par le CES VLEP et l'on peut atteindre, dans les conditions de prélèvement recommandées, une concentration de 2 VLEP-8h, en fonction de l'étude de claquage effectuée.

Capacité de la méthode pour le suivi de la VLCT-15 min :

Sans que la méthode ne précise de façon explicite le domaine sur lequel la VLCT-15 min peut être mesurée, en considérant que la limite de quantification est égale à 8,1 µg par échantillon, et pour un prélèvement de 15 min (15 L d'air) la concentration correspondante est égale à 0,54 mg.m⁻³, soit 0,05 VLCT-15 min.

Ainsi, cette méthode permettant de mesurer le dixième de la VLCT-15min, convient pour effectuer un contrôle technique de la VLCT réalisé dans un cadre réglementaire.

Incertitudes :

La fidélité globale pour la méthode est estimée à ± 10,9% (intervalle de confiance de 95%) et dans laquelle l'incertitude liée au prélèvement est de l'ordre de 5%, celle liée à l'analyse de l'ordre de 0.45%. De plus les essais de reproductibilité réalisés à partir d'atmosphère contrôlée (environ 5 mg.m⁻³ pour un prélèvement d'air de 240 L ou 88 mg.m⁻³ pour un prélèvement d'air de 15 L) après conservation à la température ambiante pendant 13 jours, conduisent à des niveaux de l'ordre de 5 à 7%.

Les différentes caractéristiques de la méthode montrent que les exigences de la norme EN 482 concernant le domaine et l'incertitude de mesure sont respectées vis-à-vis de la VLEP-8h et de la VLCT-15min recommandées par le CES. Cette méthode est donc classée en catégorie 1B pour contrôle réglementaire de la VLEP-8h, le contrôle réglementaire de la VLCT-15min. et le suivi des expositions court terme. Elle est recommandée lorsque le di-n-butyl-phtalate est présent sous forme gazeuse.

2.2.1.2 Méthode 5 : prélèvement actif sur une membrane en acétate de cellulose suivie d'un tube de gel de silice – désorption méthanol – analyse par HPLC/UV

La méthode, décrite par le protocole IFA 8387 (ou DFG méthode 2 : 2006), consiste à effectuer un prélèvement par pompage sur un ensemble de supports constitués d'une membrane filtrante en acétate de cellulose et d'un tube de gel de silice, puis à effectuer une extraction au méthanol et enfin à réaliser un dosage par chromatographie en phase liquide haute performance avec un détecteur UV.

Prélèvement :

Les supports de prélèvement sont décrits : une cassette fermée diamètre 37mm munie d'un filtre en acétate de cellulose (diamètre 37 mm et diamètre de pores 0,8 µm) et un tube de gel de silice standard (longueur de 70 mm et diamètre 6 mm) type ORBO 502.

Le débit recommandé est fixé à 1 L.min⁻¹. La méthode recommande de ne pas dépasser 2 h de prélèvement soit un volume maximal de 120 L.

La méthode convient pour prélever une phase mixte constituée d'un aérosol et d'une phase gazeuse du composé.

Domaine de validation :

La méthode a été validée sur le domaine compris entre 0,3 et 20 mg.m⁻³ (avec un prélèvement d'air de 60 L).

Le domaine de validation couvre donc l'intervalle 0,15 – 10 fois la VLEP-8h recommandée par le CES et l'intervalle 0,12 – 8 fois la VLCT-15min (c'est-à-dire 1,2 à 80 mg.m⁻³ avec un volume d'air prélevé de 15 L)

Limite de détection :

Elle n'est pas mentionnée dans la méthode.

Limite de quantification :

Elle est égale à 0,017 mg.m⁻³ pour un prélèvement de 60 L (1h de prélèvement), ce qui correspond 0,01 fois la VLEP-8h recommandée par le CES.

Pour un prélèvement de 15 L d'air, elle est égale à 0,068 mg.m⁻³, ce qui correspond à 0,01 fois la VLCT-15 min recommandée par le CES VLEP.

Efficacité d'extraction :

L'efficacité d'extraction est de l'ordre de 97% sans précision sur la manière dont elle a été déterminée ni sur quel support (filtre, gel de silice ou les deux).

Taux de récupération :

La détermination quantitative du taux de récupération dans des conditions de conservation données n'est pas mentionnée dans la méthode.

Linéarité du détecteur :

La linéarité est vérifiée sur la gamme d'étalonnage soit : 0,8 à 8 µg.mL⁻¹, ce qui correspond à une gamme de concentration de :

- 0,033 à 0,33 mg.m⁻³ pour 60 L d'air prélevé
- 0,13 à 1,3 mg.m⁻³ pour 15 L d'air prélevé.

Une dilution est effectuée si les concentrations sont supérieures à la courbe d'étalonnage.

Spécificité de la méthode :

La méthode n'est pas spécifique de la substance en ce qui concerne le prélèvement mais devient spécifique par le choix approprié de conditions chromatographiques permettant la séparation du di-n-butyl-phtalate d'autres composés interférents.

Conditions environnementales :

La méthode ne donne aucune information sur ce point

Conservation des échantillons :

Dans des conditions de conservation comprenant une période de 7 jours à température ambiante puis 14 jours à -18°C, la conservation est considérée comme satisfaisante, c'est-à-dire sans perte significative. La méthode ne précise toutefois aucune donnée quantitative.

Capacité de la méthode pour le suivi de la VLCT-15 min :

Considérant la limite de quantification de $0,068 \text{ mg.m}^{-3}$ pour un volume d'air prélevé de 15 L, la méthode permet de réaliser la mesure d'une VLCT-15min et serait aussi adaptée pour effectuer un contrôle technique de la VLCT réalisé dans un cadre réglementaire.

Incertitudes :

L'incertitude a été déterminée par dopage des supports, puis passage de l'air pendant 1 h, extraction puis analyse des échantillons. Dans le domaine de concentrations étudié compris entre $0,5$ et 9 mg.m^{-3} , l'incertitude est de l'ordre de 4 à 5%.

Les différentes caractéristiques de la méthode montrent que les exigences de la norme EN 482 vis à vis du domaine de mesure et de l'incertitude de mesure sont respectées vis-à-vis de la VLEP-8h et de la VLCT-15min recommandées par le CES. Néanmoins les données de validation ont été obtenues par dopage et passage d'un flux d'air pendant 1h. L'absence de données sur le claquage ne permet pas de juger de son applicabilité sur des durées de prélèvement plus longues.

Cette méthode est donc classée en catégorie 2 pour le contrôle réglementaire de la VLEP-8h et 1B pour le contrôle réglementaire de la VLCT-15min et le suivi des expositions court terme.

2.2.1.3 Méthode 3 : Prélèvement actif sur filtre en ester de cellulose – désorption CS2 – analyse par GC/FID

La méthode, décrite dans le protocole NIOSH 5020, consiste à effectuer un prélèvement par pompage sur un filtre en ester de cellulose puis à effectuer une extraction du filtre au sulfure de carbone et enfin à réaliser un dosage par chromatographie en phase gazeuse avec une détection en ionisation de flamme.

Prélèvement :

Le dispositif de prélèvement, constitué d'une cassette de diamètre 37 mm contenant un filtre en ester de cellulose (taille des pores de $0,8\mu\text{m}$), est bien décrit.

Le débit de prélèvement peut être compris entre 1 et 3 L.min^{-1} . La méthode recommande de ne pas dépasser un volume de 200 L, soit un prélèvement compris entre 1h07 (débit de 3 L.min^{-1}) et 3h20 (débit de 1 L.min^{-1})

La méthode convient pour prélever l'aérosol du di-n-butyl-phtalate. La géométrie du dispositif de prélèvement (cassette fermée de 37 mm) est adaptée au prélèvement de la fraction inhalable de l'aérosol.

Domaine de validation :

La méthode a été validée sur le domaine compris entre 2 et 10 mg.m^{-3} , pour des échantillons de 30 L d'air. Ce domaine correspond à un intervalle compris entre 1 et 5 fois la VLEP-8h recommandée par le CES pour 30 L d'air prélevé.

Le protocole précise que la méthode est applicable sur le domaine 0,05 à 0,5 mg par échantillon, soit :

- $1,6$ à 16 mg.m^{-3} pour 30 L d'air prélevé ou $0,25$ à $2,5 \text{ mg.m}^{-3}$ pour 200 L d'air prélevé (volume maximum recommandé), dans le cas de prélèvement de longue durée.
- 3 à 33 mg.m^{-3} pour 15 L d'air prélevé (prélèvement de 15 min à 1 L.min^{-1}) ou $1,1$ à 11 mg.m^{-3} pour 45 L d'air prélevé (volume maximal d'air prélevé pendant 15min)

Limite de détection :

Elle n'est pas mentionnée dans la méthode.

Limite de quantification :

La limite de quantification est de 0,05 mg sur le support, ce qui correspond à :

- 0,25 mg.m⁻³ pour 200 L d'air prélevé (volume maximal recommandé), soit environ 0,13 fois la VLEP-8h recommandée par le CES.
- 3,3 mg.m⁻³ pour 15 L d'air prélevé, soit environ 0,3 fois la VLCT-15min recommandée par le CES. Cette limite de quantification peut être abaissée à 1,1 mg.m⁻³ en prélevant 45 L d'air (prélèvement de 15 min au débit maximum recommandé de 3 L.min⁻¹) ce qui correspond au dixième de la VLCT-15min.

Efficacité d'extraction :

L'efficacité d'extraction est de l'ordre de 96 à 97% (détermination pour des quantités comprises entre 0,07 à 0,3 mg de di-n-butyl-phtalate sur le filtre).

Ces quantités sur le filtre correspondraient, pour un prélèvement de 200 L, à des concentrations respectives de 0,35 mg.m⁻³ et 1,5 mg.m⁻³, soit 0,18 et 0,8 fois la VLEP-8h recommandée par le CES.

Taux de récupération :

La conservation serait satisfaisante pendant plus de 6 jours à 25°C. Il n'y a pas de données chiffrées sur le rendement de cette conservation.

Linéarité du détecteur :

La méthode ne donne pas de précision sur la linéarité de la réponse du détecteur FID.

Spécificité de la méthode :

La méthode n'est pas spécifique de la substance en ce qui concerne le prélèvement mais devient spécifique de par le choix approprié de conditions chromatographiques permettant la séparation du di-n-butyl-phtalate d'autres composés interférents.

Conditions environnementales :

La méthode ne donne aucune information sur ce point

Conservation des échantillons :

Les conditions optimales sont données dans l'étude du taux de récupération.

Capacité de la méthode pour le suivi de la VLCT-15min :

La limite de quantification de la méthode, pour un prélèvement de 15 min, serait de 3,3 mg.m⁻³ pour 15 L d'air prélevé au débit de 1 L.min⁻¹ ou de 1,1 mg.m⁻³ pour 45 L d'air prélevé au débit de 3 L.min⁻¹.

Cette méthode pourrait permettre d'atteindre 0,11 fois la VLCT-15min recommandée par le CES.

Incertitudes :

L'incertitude élargie pour la méthode n'est pas précisée. Seul est donné le niveau de reproductibilité obtenu sur une série d'échantillons préparée par dopage de filtres puis analyse. Le niveau de reproductibilité atteint ainsi 5,7%.

La méthode est classée en catégorie 3 pour le contrôle de la VLEP-8h recommandée par le CES VLEP car la limite de quantification ne permet pas d'atteindre le dixième de la VLEP-8h recommandée par le CES.

La méthode est également classée en catégorie 3 pour le contrôle de la VLCT-15min car la limite de quantification ne permet pas d'atteindre 0,1 fois la VLCT-15min pour un prélèvement de 15 min à 1 L.min⁻¹. Par ailleurs cette limite pourrait être atteinte en prélevant pendant 15 min à 3 L.min⁻¹. Néanmoins aucune donnée ne permet de juger de la validation de la méthode dans ces conditions de prélèvement. Il manque en particulier les informations relatives au volume de claquage.

2.2.2 Explicitation de la classification des méthodes en catégorie 3

2.2.2.1 Méthode 1 : Prélèvement actif sur tube de mousse de polyuréthane – désorption toluène – analyse par GC/FID

La méthode, décrite dans le protocole INRS MétroPol 096, consiste à effectuer un prélèvement par pompage sur support adsorbant constitué de deux plages de mousse de polyuréthane puis à effectuer une extraction au toluène et enfin à réaliser un dosage par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur FID ou ECD.

Prélèvement :

Le dispositif de prélèvement constitué de mousse de polyuréthane (caractéristiques géométriques, capacité du support) est bien décrit.

Le débit recommandé est fixé à 1 L.min⁻¹. La méthode recommande de ne pas dépasser 30 min de prélèvement soit un volume maximal de 30 L.

La méthode pourrait convenir pour prélever la phase gazeuse du composé.

Domaine de validation :

La méthode a été validée par dopage sur l'intervalle 15 à 300 µg de DnBP sur le support, ce qui correspond à :

- 0,5 à 10 mg.m⁻³ pour un volume d'air prélevé de 30 L.
- 1 à 20 mg.m⁻³ pour un volume d'air prélevé de 15 L.

La méthode est donc validée entre 0,25 et 5 fois la VLEP-8h recommandée par le CES et entre 0,1 et 2 fois la VLCT-15min recommandée par le CES VLEP.

Limite de détection :

Elle est égale à 1,5 µg de composé/support, ce qui correspond à 0,05 mg.m⁻³ pour un prélèvement de 30 L.

Limite de quantification :

Elle n'est pas mentionnée dans la méthode. En l'absence de ce paramètre et prenant comme limite de quantification analytique 3,3xLD soit 4,95 µg, la limite de quantification dans l'air serait égale :

- à $0,17 \text{ mg.m}^{-3}$ pour un prélèvement de 30 L, soit 0,08 fois la VLEP-8h recommandée par le CES.
- à $0,33 \text{ mg.m}^{-3}$ pour un prélèvement de 15 L, soit 0,03 fois la VLCT-15min recommandée par le CES

Efficacité d'extraction :

L'efficacité d'extraction pour des niveaux de concentration de 0,5 et 10 mg.m^{-3} déterminée à partir de tubes dopés et d'un balayage de l'air de 30 L conduit à des efficacité de l'ordre de 90 et 100%.

Taux de récupération :

La détermination quantitative du taux de récupération dans des conditions de conservation à la température ambiante (les durées de conservation ne sont pas indiquées) est en moyenne de 99,6% (écart-type de 0,73%).

Linéarité du détecteur :

La linéarité du détecteur a été vérifiée entre 15 et $300 \mu\text{g}$ (désorption dans 10 mL de toluène) ce qui correspond à une gamme de $0,5$ à 10 mg.m^{-3} , ramenés à un prélèvement de 30 L d'air et à une gamme de 1 à 20 mg.m^{-3} , ramenés à un prélèvement de 15 L d'air.

Spécificité de la méthode :

La méthode n'est pas spécifique de la substance en ce qui concerne le prélèvement mais devient spécifique par le choix approprié de conditions chromatographiques permettant la séparation du di-n-butyl-phtalate d'autres composés interférents.

Conditions environnementales :

La méthode ne donne aucune information sur ce point

Conservation des échantillons :

Dans des conditions de conservation ambiantes, les tubes peuvent être conservés au moins 8 jours. Les données quantifiées sur le taux de récupération sont données précédemment.

Domaine de mesure accessible :

Selon la valeur de la limite de quantification indiquée précédemment et pour un prélèvement recommandé de 30 L, il est possible d'atteindre $0,17 \text{ mg.m}^{-3}$ soit 0,08 fois la VLEP-8h recommandée par le CES.

Incertitude :

La méthode ne donne aucune estimation d'incertitude.

La méthode est classée en catégorie 3 pour le contrôle de la VLEP-8h recommandée par le CES VLEP en raison du fait notamment qu'elle a été validée pour des prélèvements d'une durée de 30 min et que les données de validation établies ne permettent pas de juger de son applicabilité pour des prélèvements de plus longue durée. Les conditions de claquage n'ont en effet pas été étudiées. Par ailleurs la méthode ne donne aucune estimation d'incertitude.

La méthode est également classée en catégorie 3 pour le contrôle de la VLCT-15min recommandée par le CES VLEP. En effet, bien que la limite de quantification permette d'atteindre le dixième de la VLCT-15min et que le domaine de validation couvre l'intervalle 0,1 à 2 VLCT-15min, la méthode ne donne aucune estimation d'incertitude de mesure.

2.2.2.2 Méthode 4 : Prélèvement actif sur filtre en nitrate de cellulose – désorption dans un mélange eau/acétonitrile – analyse par HPLC/UV

La méthode, décrite par le protocole IRSST 308-1, consiste à effectuer un prélèvement par pompage sur une membrane filtrante en nitrate de cellulose, puis à effectuer une extraction dans un mélange eau/acétonitrile et enfin à réaliser un dosage par chromatographie en phase liquide haute performance avec un détecteur UV.

Le protocole de l'IRSST ne précise que la limite de quantification de cette méthode. Celle-ci est de 8 µg par échantillon. Ainsi, pour un prélèvement maximal de 30 L recommandé par le protocole, la limite de quantification de la méthode serait égale à 0,27 mg.m⁻³ soit environ 0,14 fois la VLEP-8h recommandée par le CES.

Aucune autre donnée de validation n'est mentionnée.

De ce fait, la méthode est classée en catégorie 3 pour le contrôle de la VLEP-8h et de la VLCT-15min recommandée par le CES.

3. Conclusions et recommandations

Deux méthodes disposent des éléments de validation pour répondre aux exigences de la norme EN 482 et peuvent ainsi permettre de déterminer la concentration du di-n-butyl-phtalate aux fins de comparaison avec la VLEP-8h et la VLCT-15min pragmatique recommandées par le CES :

- **La méthode 2 décrite par le protocole OSHA 104** consistant à effectuer un prélèvement sur un tube OVS, composé d'un filtre en fibre de verre et de 2 zones de ténax (140/70 mg) puis à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (détecteur FID) après désorption des supports dans le toluène.
- **La méthode 5 décrite par le protocole DFG** (ou méthode IFA 8287) consistant à effectuer un prélèvement sur un ensemble constitué d'un filtre en acétate de cellulose (diamètre 37 mm) et d'un tube de gel de silice (type ORBO 502-Supelco) puis à l'analyse par chromatographie en phase liquide (détecteur DAD) après désorption des supports dans le méthanol.

Néanmoins, ces deux méthodes ne sont pas équivalentes.

Afin de choisir la méthode la plus appropriée, il convient au préalable de s'assurer si le composé est présent sous forme d'un aérosol, d'une phase gazeuse ou d'une phase mixte (aérosol + gaz) :

- Lorsqu'on est en présence d'une phase mixte du di-n-butyl-phtalate (aérosol + gaz) ou d'un aérosol seul de ce composé, l'ensemble du dispositif de prélèvement décrit dans le protocole DFG peut permettre, en mettant en œuvre une cassette fermée de 37 mm, en amont du tube de gel de silice, et au débit recommandé de $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, de s'assurer de la collecte de la fraction inhalable de l'aérosol, selon la norme EN 481.
- En revanche, dans ce cas, le protocole donné par l'OSHA ne pourrait pas convenir car la fraction de l'aérosol prélevée par le tube OVS n'est pas connue. Ainsi, le protocole de l'OSHA ne conviendrait que si l'on est sûr d'être en présence uniquement de la seule phase gazeuse du di-n-butyl-phtalate.

Par ailleurs, les critères de validation de ces méthodes ne permettent pas de les classer au même niveau quel que soit le type de VLEP à contrôler. Ainsi :

- Lorsque le di-n-butyl-phtalate est présent sous la seule forme gazeuse :
 - La méthode 2 est partiellement validée pour le contrôle technique de la VLEP-8h recommandée par le CES VLEP, pour le contrôle technique de la VLCT-15min pragmatique recommandée par le CES VLEP et le suivi des expositions court terme.
- Lorsque le di-n-butyl-phtalate est présent sous forme d'une phase mixte ou d'un aérosol seul :
 - Seule la méthode 5 permet de prélever la fraction inhalable. Elle est partiellement validée pour le contrôle technique de la VLCT-15min pragmatique recommandée par le CES VLEP, mais indicative pour le contrôle technique de la VLEP-8h recommandée par le CES VLEP du fait des données de validation obtenues par dopage et passage d'un flux d'air pendant 1h.

Lorsque le di-n-butyl-phtalate est présent sous forme d'un aérosol seul, la méthode 3 décrite par le protocole NIOSH NMAM 5020, permet de prélever la fraction inhalable. Elle est partiellement validée pour le suivi des expositions court terme. Par contre, elle ne permet pas d'atteindre le

dixième de la VLCT-15min pragmatique recommandée par le CES VLEP ni le dixième de la VLEP-8h. Elle n'est donc pas adaptée pour le contrôle technique de la VLCT-15min et de la VLEP-8h.

Les autres méthodes, à savoir la méthode MétroPol 96 de l'INRS et la méthode 308-1 de l'IRSST, sont classées en catégorie 3, du fait de l'insuffisance ou du caractère incomplet des données publiées, rendant impossible de s'assurer du respect de l'ensemble des exigences de la norme EN 482.

Le groupe recommande donc les méthodes suivantes :

Méthode	Protocole	Catégorie		
		pour contrôle technique réglementaire de la VLEP-8h	pour contrôle technique réglementaire de la VLCT-15min	pour le suivi des expositions court terme
Méthode 2 : prélèvement actif sur tube OVS – désorption dans le toluène – analyse par GC/FID	OSHA 104 : 1994	1 B <u>Si présence uniquement phase gazeuse</u>		
Méthode 5 : prélèvement actif sur une membrane en acétate de cellulose suivie d'un tube de gel de silice – désorption méthanol – analyse par HPLC/UV	IFA 8387 : 2009 DFG méthode 2 : 2006	2	1 B	
		<u>Si présence d'une phase mixte (aérosol + gaz) ou aérosol</u>		
Méthode 3 : Prélèvement sur membrane en ester de cellulose - Désorption dans CS ₂ - Analyse par chromatographie en phase gazeuse (détecteur FID)	NIOSH NMAM 5020, issue 2 : 1994	3		1B
		<u>Si uniquement phase aérosol</u>		

4. Bibliographie

NF EN 482 : 2012 - Atmosphères des lieux de travail - Exigences générales concernant les performances des modes opératoires de mesurage des agents chimiques

INRS MétroPol : fiche 96/V01.01 : 2006 : Phtalates par chromatographie en phase gazeuse
([http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.Nsf/IntranetObject-accesParReference/Metropol%20096/\\$File/096.pdf](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.Nsf/IntranetObject-accesParReference/Metropol%20096/$File/096.pdf))

OSHA 104 : 1994 : Dimethyl Phthalate (DMP), Diethyl Phthalate (DEP), Dibutyl Phthalate (DBP), Di-2-Ethylhexyl Phthalate (DEHP), Di-n-Octyl Phthalate (DNOP)
(<http://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org104/org104.html>)

NIOSH NMAM 5020, issue 2 : 1994 – Di (2-ethylhexyl) phthalate et dibutylphthalate
(<http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/5020.pdf>)

IRSST : méthode 308.-1 : Phtalate de dibutyle
(<http://www.irsst.qc.ca/-RSST84-74-2.html>)

DFG méthode 2 : 2006 : Phthalates (Butylbenzyl-, Diallyl-, Dibenzyl-, Di-n-butyl-, Dicyclohexyl-, Diethyl-, Di(2-ethylhexyl) phthalate)
(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.am8461e0011/pdf>)

IFA : méthode 8387 : 2009 : Phthalate
(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.am8461e0011/pdf>)

La synthèse et les conclusions de l'expertise collective ont été adoptées par le CES « Expertise en vue de la fixation de valeurs limites à des agents chimiques en milieu professionnel » le 14 décembre 2015.

Au nom des experts du CES

Le président du CES

ANNEXES

Annexe 1 : annexe de la partie B : Support technique : présentation détaillée des méthodes de mesure dans l'air des lieux de travail

Annexe 1.1 : Méthode 1 : Prélèvement par piégeage sur support adsorbant ou adsorbant+filtre– désorption dans le toluène – analyse par GC/FID

METHODE 1		Prélèvement par piégeage sur support adsorbant ou adsorbant+filtre– désorption dans le toluène – analyse par GC/FID <i>INRS MétroPol 96</i>
Paramètres		
DESCRIPTION		
Gaz/vapeur – Aérosol - Mixte		Le composé est constitué d'une phase gazeuse
Prélèvement	Actif / passif	Prélèvement actif
	Système de prélèvement	Tube en verre constitué de 2 zones de mousses de polyuréthane sur 4 cm de densité 25-27 kg/m ³ et de caractéristiques géométriques : longueur 150 mm ; diamètre intérieur 8 mm
	Débit	Débit recommandé = 1 L.min ⁻¹
	Volume	Volume d'air maximal recommandé : 30 L
	Durée	Durée recommandée : 30 min (pour la VLEP-8 h) et 15 min (pour la VLCT).
Analyse	Préparation échantillon	Désorption des 2 zones de mousse ensemble dans 10 mL de toluène. Agitation aux ultra-sons de 4 minutes.
	Technique d'analyse	Chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur FID ou à capture d'électrons
	Paramètres analytiques	Température injecteur : 290 - 300°C Température détecteur : 290 - 300°C Colonne : BP-1 (longueur 25 m, diamètre intérieur 0,53 mm, épaisseur de 0.32 mm, phase stationnaire 0,5 µm) Température de colonne : 0,5 min (90°C) puis 30°C.min ⁻¹ de 90 à 290°C et 4,5 min (290°C)

METHODE 1	Prélèvement par piégeage sur support adsorbant ou adsorbant+filtre– désorption dans le toluène – analyse par GC/FID <i>INRS MétroPol 96</i>
DONNEES DE VALIDATION	
Paramètres	
Domaine de validation	Les conditions sont non renseignées
Coefficient de désorption / Efficacité de désorption	Pour des concentrations comprises entre 0,5 et 10 mg.m ⁻³ , le coefficient moyen d'absorption désorption Kt = 100% avec un écart-type de 0,54% (déterminé par dopage de 15µg à 300 µg de DnBP et 30 L d'air prélevé)
Taux de récupération	Non renseigné
Données de validation expérimentale du débit d'échantillonnage	Non applicable
Capacité / Volume de claquage	Non renseigné
Linéarité de réponse du détecteur (instrument d'analyse)	La linéarité a été vérifiée pour une quantité de composé comprise entre 15 et 300 µg (dans 10 mL de toluène) équivalents à des concentrations entre 0,5 et 10 mg.m ⁻³ (pour un prélèvement de 30 L d'air)
Essais de conservation et de stockage avant analyse	Les tubes peuvent être conservés 8 jours à température ambiante. A partir d'échantillons dopés à 15 µg, 150 µg et 300 µg, le taux de récupération moyen = 99,6% avec un écart-type de 0,73%
Conditions environnementales	Non renseigné
Sélectivité	Compte tenu de la présence probable de phtalates dans de nombreux matériaux, il est impératif de vérifier l'absence d'interférents sur des échantillons à blanc (solutions de désorption de tronçons de mousses)
Spéciation	Méthode applicable pour une famille de phtalates

METHODE n°1		Prélèvement par piégeage sur support adsorbant ou adsorbant+filtre– désorption dans le toluène – analyse par GC/FID <i>INRS MétroPol 96</i>
CARACTERISTIQUES		
Paramètres		
Conditions de détermination de VLEP-8h	Estimation de l'incertitude élargie	Non renseigné
	Limite de détection	1,5 µg par échantillon, soit 0,05 mg.m ⁻³ pour 30L d'air prélevé
	Limite de quantification	Non renseigné
Conditions de détermination de VLCT-15min	Estimation de l'incertitude élargie	Non renseigné
	Limite de détection	1,5 µg par échantillon, soit 0,1 mg.m ⁻³ pour 15 L d'air prélevé
	Limite de quantification	Non renseigné
Informations complémentaires		

Annexe 1.2 : Méthode 2 : prélèvement actif sur tube OVS – désorption dans le toluène – analyse par GC/FID

METHODE n°2		Prélèvement actif sur tube OVS – désorption dans le toluène – analyse par GC/FID <i>OSHA 104 : 1994</i>
Paramètres		
Gaz/vapeur – Aérosol - Mixte		Le composé est constitué d'une phase mixte (aérosol + phase gazeuse)
Prélèvement	Actif / passif	Prélèvement actif (passage d'un flux d'air au moyen d'une pompe)
	Système de prélèvement	Prélèvement sur tubes OVS constitués d'un filtre en fibre de verre + 2 zones de ténax (140+ 70 mg) de caractéristiques géométriques : longueur 75 mm ; diamètre extérieur 13 mm ; diamètre intérieur 6 mm
	Débit	Débit recommandé = 1 L.min ⁻¹
	Volume	Volume d'air maximal recommandé : 240 L
	Durée	Durée recommandée : 4 heures (pour la VLEP-8h) et 15 min (pour la VLCT-15min).
Analyse	Préparation échantillon	Désorption séparée de l'ensemble filtre + zone de 140 mg de ténax, et de l'ensemble zone de 70 mg de ténax dans 4 mL de toluène. Agitation mécanique pendant 30 minutes.
	Technique d'analyse	Chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur FID.
	Paramètres analytiques	Température injecteur : 270°C Température détecteur : 275°C Colonne : HP-1 (longueur 5 m, diamètre intérieur 0,53 mm, phase stationnaire 2,65 µm) Température de colonne : 1 min (75°C) puis 15°C.min ⁻¹ de 75 à 270°C et 1 min (270°C)

METHODE n°2	Prélèvement actif sur tube OVS – désorption dans le toluène – analyse par GC/FID <i>OSHA 104 : 1994</i>
Paramètres	
Domaine de validation / étendue de mesure	Non renseigné
Coefficient de désorption / Efficacité de désorption	L'efficacité moyenne de désorption, déterminée par dopage avec 617,8 à 2471 µg de DnBP, (soit 2,6 à 10,3 mg.m ⁻³ pour 240 L d'air prélevé) est égale à 99,8%. Les coefficients de désorption sont les suivants : 101,4% pour 61,8 µg ; 97,6% pour 123,6 µg ; 100,1% pour 247,1 µg ; 101,1% pour 617,8 µg ; 99,2% pour 1235,5 µg ; 99,2% pour 2471 µg
Taux de récupération	Taux de récupération de 99,1% pour des échantillons stockés à température ambiante pendant 15 jours.
Données de validation expérimentale du débit d'échantillonnage	Non applicable
Capacité / Volume de claquage	Volume de claquage : > 300 L dans les conditions suivantes : débit de 1 L.min ⁻¹ , humidité relative de 80%, température de 25°C, concentration de 8,78 mg.m ⁻³ .
Linéarité de réponse du détecteur (instrument d'analyse)	La linéarité de réponse du détecteur est vérifiée sur l'intervalle correspondant à 2,6 à 10,3 mg.m ⁻³ (pour un volume d'air prélevé de 240L) ou à 41 à 164,7 mg.m ⁻³ pour un volume d'air prélevé de 15 L.
Essais de conservation et de stockage avant analyse	Essais de conservation sur 36 échantillons : - 6 échantillons analysés le jour de la préparation - 15 échantillons stockés à 5°C - 15 échantillons stockés à 22°C puis stockage pendant 15 jours. A température ambiante, taux de récupération > 96.4% et à 5°C, taux de récupération > 98.3%.
Conditions environnementales	Non renseigné
Sélectivité	Interférences (prélèvement) : La présence d'autres contaminants organiques dans l'air réduit la capacité de prélever de capter le composé. La suspicion d'interférences doit être signalée au laboratoire avec les échantillons présentés. Interférences (analyse) : Tout composé produisant une réponse en FID au même temps de rétention que l'un des analytes ou l'étalon interne est un interférent possible. Si un interférent potentiel est signalé, il doit être examiné avant que les échantillons soient désorbés. En règle générale, les conditions chromatographiques peuvent être modifiées de façon à séparer un interférent de l'analyte.
Spéciation	Méthode applicable pour une famille de phtalates

METHODE n°2		Prélèvement actif sur tube OVS – désorption dans le toluène – analyse par GC/FID OSHA 104 : 1994
Paramètres		
Conditions de détermination de VLEP-8h	Estimation de l'incertitude élargie	Incertitude élargie (intervalle de confiance à 95%) = +/- 10%, dont incertitude liée au prélèvement (5%) et incertitude liée à l'analyse (4,5%) Essais de reproductibilité réalisés à partir d'atmosphère contrôlée (environ 5 mg.m ⁻³ pour un prélèvement d'air de 240 L ou 88 mg.m ⁻³ pour un prélèvement d'air de 15 L) après conservation à la température ambiante pendant 13 jours = 5 à 7%.
	Limite de détection	LD = 10 µg.m ⁻³ (volume prélevé de 240 L) déterminé par dopage d'un tube avec 2,4 µg de composé.
	Limite de quantification	LQ = 34 µg.m ⁻³ (volume prélevé de 240 L) déterminé par dopage d'un tube avec 8,1 µg de composé.
Conditions de détermination de VLCT-15min	Estimation de l'incertitude élargie	Non renseigné
	Limite de détection	2,4 µg de composé, soit 0,16 mg.m ⁻³ pour un volume d'air prélevé de 15 L
	Limite de quantification	8,1 µg de composé 0,54 mg.m ⁻³ pour un volume d'air prélevé de 15 L.
Informations complémentaires		

Annexe 1.3 : Méthode 3 : Prélèvement par piégeage sur filtre en ester de cellulose – désorption dans le sulfure de carbone – analyse par GC/FID

METHODE n°3		Prélèvement par piégeage sur filtre en ester de cellulose – désorption dans le sulfure de carbone – analyse par GC / FID <i>NIOSH NMAM Method 5020, issue 2 : 1994</i>
Paramètres		
Gaz/vapeur – Aérosol - Mixte		Le composé est constitué d'un aérosol
Prélèvement	Actif / passif	Prélèvement actif (passage d'un flux d'air au moyen d'une pompe)
	Système de prélèvement	Prélèvement sur un filtre en ester de cellulose, diamètre de pores 0,8 µm, contenu dans une cassette de 37 mm.
	Débit	Débit recommandé = compris entre 1 et 3 L.min ⁻¹
	Volume	Volume d'air maximal recommandé : 300 L
	Durée	Non renseigné.
Analyse	Préparation échantillon	Désorption du filtre dans 2 mL de sulfure de carbone. Agitation aux ultra-sons de 30 minutes.
	Technique d'analyse	Chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur FID
	Paramètres analytiques	Température injecteur : 300°C Température détecteur : 300°C Colonne : (longueur 2 m, diamètre intérieur 3 mm, phase stationnaire constituée de 5% de OV 1 sur du Chromosorb W-HP de 100/120 mesh) Température de colonne : 200 à 250 °C.

METHODE n°3	Prélèvement par piégeage sur filtre en ester de cellulose – désorption dans le sulfure de carbone – analyse par GC / FID <i>NIOSH NMAM Method 5020, issue 2 : 1994</i>
Paramètres	
Domaine de validation / étendue de mesure	Validation sur le domaine de 2 à 10 mg.m ⁻³ , pour des échantillons de 30 L d'air à 23°C et une pression de 767 mm Hg
Coefficient de désorption / Efficacité de désorption	Efficacité d'extraction de 97% dans le domaine compris entre 0,07 et 0,3 mg de composé par échantillon.
Taux de récupération	Non renseigné
Données de validation expérimentale du débit d'échantillonnage	Non approprié
Capacité / Volume de claquage	Volume d'air maximal recommandé : 300 L
Linéarité de réponse du détecteur (instrument d'analyse)	Non renseigné
Essais de conservation et de stockage avant analyse	Conservation satisfaisante pendant au moins 6 jours à température ambiante à 25°C.
Conditions environnementales	Non renseigné
Sélectivité	Non renseigné
Spéciation	Non renseigné

METHODE n°3		Prélèvement par piégeage sur filtre en ester de cellulose – désorption dans le sulfure de carbone – analyse par GC / FID <i>NIOSH NMAM Method 5020, issue 2 : 1994</i>
Paramètres		
Conditions de détermination de VLEP-8h	Estimation de l'incertitude élargie	Incertitude globale non estimée. Reproductibilité obtenue à partir de l'analyse de filtres dopés = 0,057 Justesse non déterminée ; Biais considéré comme non significatif.
	Limite de détection	<i>Estimation de la LD = 0,01 mg par échantillon Soit 0,05 mg.m⁻³ pour 200 L d'air prélevé.</i>
	Limite de quantification	0,05 mg par échantillon <i>Soit 0,25 mg.m⁻³ pour 200 L d'air prélevé.</i>
Conditions de détermination de VLCT-15min	Estimation de l'incertitude élargie	Non renseigné
	Limite de détection	0,01 mg par échantillon <i>Soit 0,67 mg.m⁻³ pour 15 L d'air prélevé.</i>
	Limite de quantification	0,05 mg par échantillon <i>Soit 3,3 mg.m⁻³ pour 15 L d'air prélevé.</i>

Annexe 1.4 : Méthode 4 : Prélèvement par piégeage sur filtre en nitrate de cellulose– désorption dans un mélange acétonitrile/eau – analyse par HPLC/UV

METHODE n°4		Prélèvement par piégeage sur filtre en nitrate de cellulose– désorption dans un mélange acétonitrile/eau – analyse par HPLC/UV <i>IRSST – méthode 308-1</i>
Paramètres		
Gaz/vapeur – Aérosol - Mixte		Le composé est constitué d'un aérosol.
Prélèvement	Actif / passif	Prélèvement actif
	Système de prélèvement	Prélèvement sur un filtre en nitrate de cellulose, de marque WHATMAN type 7188003 (NC-37)
	Débit	Débit recommandé = 1 L.min ⁻¹
	Volume	Volume d'air maximal recommandé : 30 L
	Durée	Non renseigné
Analyse	Préparation échantillon	Désorption dans un mélange eau/acétonitrile
	Technique d'analyse	Analyse par chromatographie en phase liquide avec détecteur UV
	Paramètres analytiques	Non renseigné

METHODE n°4	Prélèvement par piégeage sur filtre en nitrate de cellulose– désorption dans un mélange acétonitrile/eau – analyse par HPLC/UV <i>IRSST – méthode 308-1</i>
Paramètres	
Domaine de validation / étendue de mesure	Non renseigné
Coefficient de désorption / Efficacité de désorption	Non renseigné
Taux de récupération	Non renseigné
Données de validation expérimentale du débit d'échantillonnage	Non renseigné
Capacité / Volume de claquage	Non renseigné
Linéarité de réponse du détecteur (instrument d'analyse)	Non renseigné
Essais de conservation et de stockage avant analyse	Non renseigné
Conditions environnementales	Non renseigné
Sélectivité	Non renseigné
Spéciation	Non renseigné

METHODE n°4	Prélèvement par piégeage sur filtre en nitrate de cellulose– désorption dans un mélange acétonitrile/eau – analyse par HPLC/UV <i>IRSST – méthode 308-1</i>	
Paramètres		
Conditions de détermination de VLEP-8h	Estimation de l'incertitude élargie	Non renseigné
	Limite de détection	Non renseigné
	Limite de quantification	8 µg par échantillon, soit 0,26 mg.m ⁻³ pour 30 L d'air prélevé
Conditions de détermination de VLCT-15min	Estimation de l'incertitude élargie	Non renseigné.
	Limite de détection	Non renseigné
	Limite de quantification	8 µg par échantillon, soit 0,53 mg.m ⁻³ pour 15 L d'air prélevé

Annexe 1.5 : Méthode 5 : Prélèvement par piégeage sur un ensemble filtre en acétate de cellulose et tube de gel de silice – désorption dans le méthanol – analyse par HPLC/DAD

METHODE n°5		Prélèvement par piégeage sur un ensemble filtre en acétate de cellulose et tube de gel de silice – désorption dans le méthanol– analyse par HPLC/DAD DFG méthode 2 :2006 et IFA : méthode 8387 : 2009
Paramètres		
Gaz/vapeur – Aérosol - Mixte		Le composé est constitué d'une phase mixte (aérosol + phase gazeuse)
Prélèvement	Actif / passif	Prélèvement actif (passage d'un flux d'air au moyen d'une pompe)
	Système de prélèvement	Prélèvement sur un ensemble filtre en acétate de cellulose (diamètre de pores 0,8 µm) de 37 mm de diamètre + un tube de gel de silice (type orbo 502-SUPELCO)
	Débit	Débit recommandé = 1 L.min ⁻¹
	Volume	Volume d'air maximal recommandé : 120 L
	Durée	Durée maximale recommandée : de 1 à 2 heures
Analyse	Préparation échantillon	Désorption de l'ensemble filtre + tube gel de silice dans 2,5 mL de méthanol. Agitation mécanique pendant 1 h.
	Technique d'analyse	Analyse par chromatographie en phase liquide avec détecteur DAD
	Paramètres analytiques	Colonne : Kromasil C18 (longueur 0,25 m ; diamètre intérieur 4 mm ; taille des particules 5 µm) Température de colonne : 23°C Eluants : (A) acétonitrile-eau (70%/30%) et (B) acétonitrile Gradient : 3 min (A) puis 10 min (B) 10 min (B) et (A) au delà de 23 min ; débit d'éluant : 0,8 mL.min ⁻¹ . Longueur d'onde du détecteur : 230 nm

METHODE n°5	Prélèvement par piégeage sur un ensemble filtre en acétate de cellulose et tube de gel de silice – désorption dans le méthanol– analyse par HPLC/DAD DFG méthode 2 :2006 et IFA : méthode 8387 : 2009
Paramètres	
Domaine de validation / étendue de mesure	Domaine entre 0,3 et 20 mg.m ⁻³ . Données de validation obtenues par dopage et passage d'un flux d'air (60L pendant 1h).
Coefficient de désorption / Efficacité de désorption	Efficacité de désorption moyenne = 96,6%
Taux de récupération	Non renseigné
Données de validation expérimentale du débit d'échantillonnage	Non renseigné
Capacité / Volume de claquage	Non renseigné
Linéarité de réponse du détecteur (instrument d'analyse)	La linéarité est vérifiée sur la gamme d'étalonnage soit : 0,8 à 8 µg.mL ⁻¹ , ce qui correspond à une gamme de concentration de : - 0,033 à 0,33 mg.m ⁻³ pour 60 L d'air prélevé - 0,13 à 1,3 mg.m ⁻³ pour 15 L d'air prélevé. Une dilution est effectuée si les concentrations sont supérieures à la courbe d'étalonnage
Essais de conservation et de stockage avant analyse	Conservation satisfaisante pendant 14 jours englobant une période de 7 jours à température ambiante puis ensuite au froid (T < -18°C)
Conditions environnementales	Non renseigné
Sélectivité	Non renseigné
Spéciation	Non renseigné

METHODE n°5		Prélèvement par piégeage sur un ensemble filtre en acétate de cellulose et tube de gel de silice – analyse par HPLC/DAD DFG méthode 2 :2006 et IFA : méthode 8387 : 2009
Paramètres		
Conditions de détermination de VLEP-8h	Estimation de l'incertitude élargie	Incertitude = comprise entre 4 et 5% dans un domaine de concentrations compris entre 0,5 et 10 mg.m ⁻³ (pour 60L d'air prélevé)
	Limite de détection	Non renseigné
	Limite de quantification	LQ = 0,017 mg.m ⁻³ pour un prélèvement de 60 L d'air
Conditions de détermination de VLCT-15min	Estimation de l'incertitude élargie	Non renseigné
	Limite de détection	Non renseigné
	Limite de quantification	0,068 mg.m ⁻³ , pour 15 L d'air prélevé (déterminée à partir de la LQ établie pour 60L d'air prélevé)

Annexe 2 - Consultation publique

Ce rapport a fait l'objet d'une consultation publique sur le site internet de l'Anses du 27/08/2014 au 28/10/2014.

Aucun commentaire n'a été reçu.

Annexe 3 : Suivi des mises à jour du rapport

Date	Version	Description de la modification
11/10/2013	01	Version pour consultation publique
Décembre 2014	02	Version après consultation (pas de commentaires ; ajout pour signaler la procédure de consultation et mise à jour du préambule du rapport)
Décembre 2015	03	Version finale (version amendée suite à l'identification d'une erreur de calcul dans la construction de la VLEP-8h)



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 / [@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)