

# TOURS

14-15-16 Octobre  
2014



24<sup>èmes</sup>  
Journées Nationales  
sur les Dispositifs  
Medicaux



EURO-PHARMAT  
Métropole  
TSA 80033  
31028 TOULOUSE Cedex 9  
Tel : 05 61 77 82 70  
Fax : 05 61 77 82 64  
e-mail : europe@europharmat.com

[www.euro-pharmat.com](http://www.euro-pharmat.com)

## CYTOTOXICITE DES PLASTIFIANTS DU PVC ET DE LEURS MÉTABOLITES

Pierre Gabriel PINTA, Gaël GRIMANDI

Pharmacie Centrale CHU de Nantes, INSERM U791 (LIOAD)

# Introduction

2

<b>Plastifiants alternatifs au DEHP</b>	<b>Métabolites primaires principaux</b>
<b>DEHT</b> (Di-2-ethylhexyle téréphtalate)	<b>MEHT</b> (Monoethylhexyle téréphtalate)
<b>DINP</b> (Di-iso-nonyle phtalate)	<b>MINP</b> (Mono-iso-nonyle phtalate)
<b>DINCH</b> (Acide 1,2-Cyclohexanedicarboxylique)	<b>MINCH</b> (Acide Cyclohexanecarboxylique)
<b>DEHA</b> (Di-2-ethylhexyle adipate)	<b>MEHA</b> (Monoethylhexyle adipate)
<b>TOTM</b> (Triocyltrimellitate)	<b>MOTM</b> (Monooctyltrimellitate)
<b>ATBC</b> (Acétyle tri-n-butyle citrate)	

# Matériels et méthodes

3

## Etudes de cytotoxicité selon la norme EN NF ISO 10 993-5 (biocompatibilité des DM)

### Obtention des matériaux

- **Plastifiants** : Pool commun au projet ARMED
- **Métabolites primaires principaux** : Synthétisés (UMR 990 Clermont-ferrand) car non disponibles sur le marché

### Choix du type cellulaire

- **Fibroblastes murins L929**

### Tests de cytotoxicité

- **Tests à partir d'extraits**



**Lipophilie des plastifiants**

### Evaluation de la cytotoxicité

- **Test au bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumn (MTT test)**

# Matériels et méthodes

4

- 1. Spécificité et linéarité du MTT Test**
- 2. Choix d'un solvant des plastifiants**
- 3. Evaluation de la cytotoxicité du solvant**
- 4. Tests de cytotoxicité des plastifiants**

# Matériels et méthodes

5

- **Spécificité du MTT Test**
  - Principe :
    - Capacité du MTT test à ne révéler que les cellules viables après contact d'un agent cytotoxique
    - Cultures cellulaires avec du milieu de culture supplémenté par de l'actinomycine D (inducteur d'apoptose) et comparaison de la prolifération cellulaire par rapport à un témoin

# Matériels et méthodes

6

- **Spécificité du MTT Test**
  - Ensemencement de cellules dans des plaques 96 puits ( $10^4$  cellules/puits)
  - Adhésion pendant 24h
  - Cultures cellulaires sur 5 jours sous 2 conditions
    - Contrôle (DMEM)
    - Test (DMEM + 0,1% d'Actinomycine D)
  - Réalisation du MTT Test tous les jours

# Matériels et méthodes

7

## ■ Linéarité du MTT test

- Ensemencement des cellules dans des plaques de culture 96 puits

- **Densités cellulaires croissantes**

( $5 \times 10^3$  -  $10 \times 10^3$  -  $50 \times 10^3$  -  $100 \times 10^3$  -  $150 \times 10^3$  -  $200 \times 10^3$  -  $250 \times 10^3$  -  $300 \times 10^3$  -  $350 \times 10^3$  )

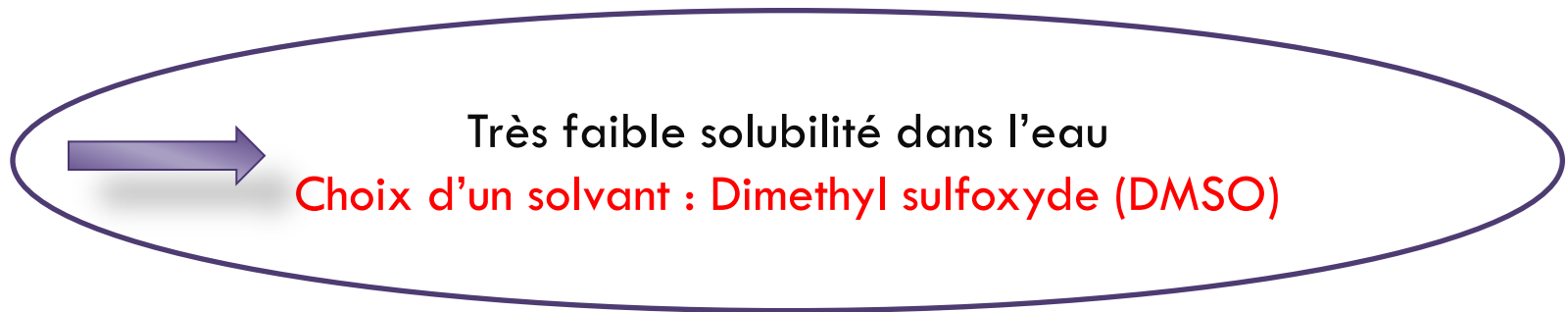
- Contact pendant 8 h
- Réalisation du MTT test

# Matériels et méthodes

8

## ■ Solubilisation des plastifiants dans le DMEM

Plastifiants	DEHP	DEHT	DINP	DINCH	TOTM	DEHA	ATBC
Solubilité dans l'eau (mg/L)	0.003	0.0004	0.0006	0.02	0.13	0.78	20



Solubilisation en réalisant des solutions mères à 1% de plastifiants dans du DMSO  
(Limite de solubilité des plastifiants dans le DMSO)



# Matériels et méthodes

9

- Cytotoxicité du solvant sélectionné (DMSO)
  - Ensemencement des cellules dans des plaques 96 puits ( $10^4$  cellules/puits)
  - Adhésion des cellules pendant 24 h
  - Cultures cellulaires sur 7 jours (J1 à J7) sous 2 conditions :
    - **Contrôle (DMEM)**
    - **Test ( DMEM + DMSO (0.1, 0.5, 1, 2.5 et 5 %))**
  - Réalisation du MTT test tous les jours (J1 à J7)

# Matériels et méthodes

10

## ■ Tests de cytotoxicité des plastifiants et leurs métabolites

➔ **Dilutions des solutions mères (1%) dans du milieu de culture (DMEM)**

- 0.1 % de plastifiants (0.01 mg/mL)
- 0.5 % de plastifiants (0.05 mg/mL)
- 1.0 % de plastifiants (0.1 mg/mL)

➔ **Solutions contrôles : DMEM, DMEM + DMSO (0.1, 0.5 et 1%)**

# Matériels et méthodes

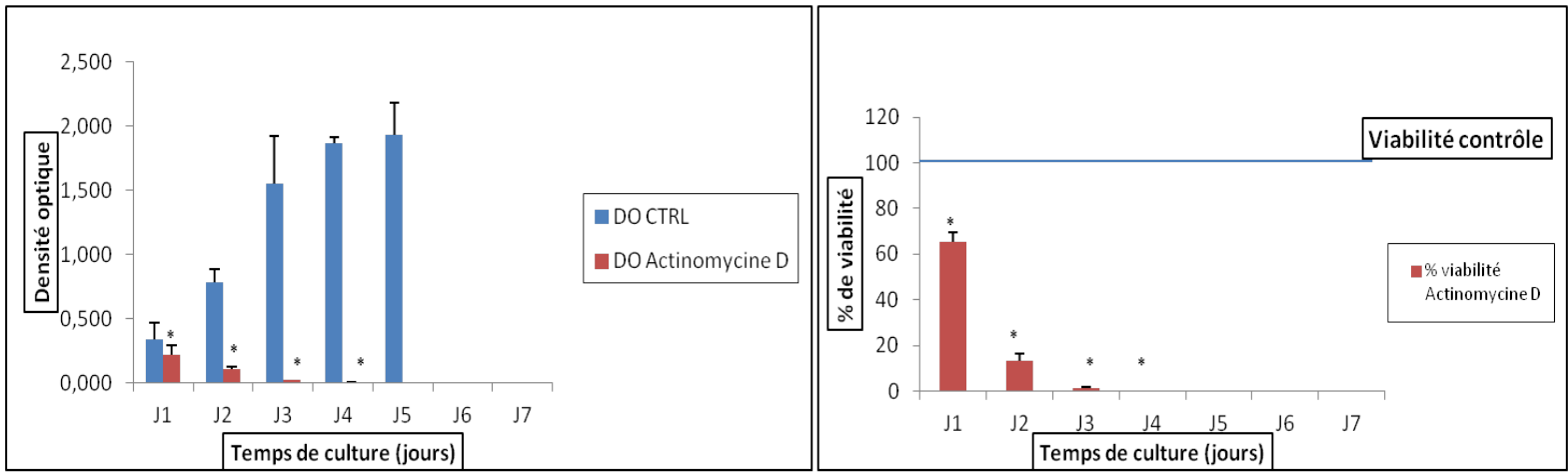
11

- Tests de cytotoxicité des plastifiants et leurs métabolites
  - Culture des fibroblastes pendant 7 jours
    - Avec et sans changement quotidien de milieu de culture
  - MTT test
    - Estimation du pourcentage de viabilité cellulaire

# Résultats

12

## 1. Spécificité du MTT Test



\*  $p < 0.05$  Actinomycin D vs control

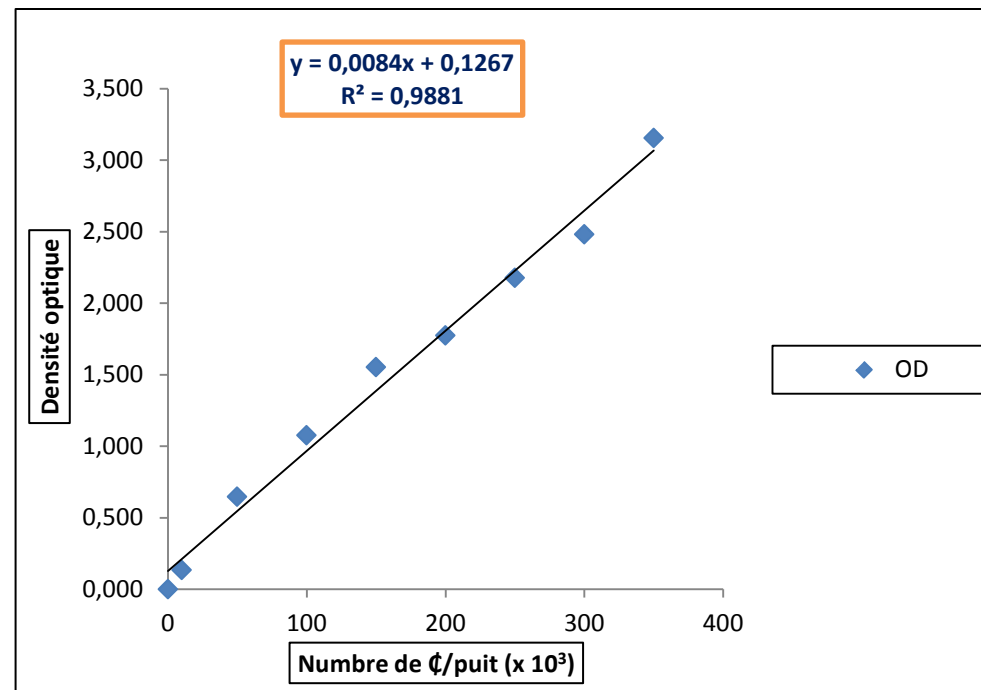
**Diminution de la viabilité cellulaire des puits contenant de l'actinomycine D par rapport au témoin**

**Signe de la spécificité du MTT test à détecter des cellules viables**

# Résultats

13

## 2. Linéarité du MTT Test



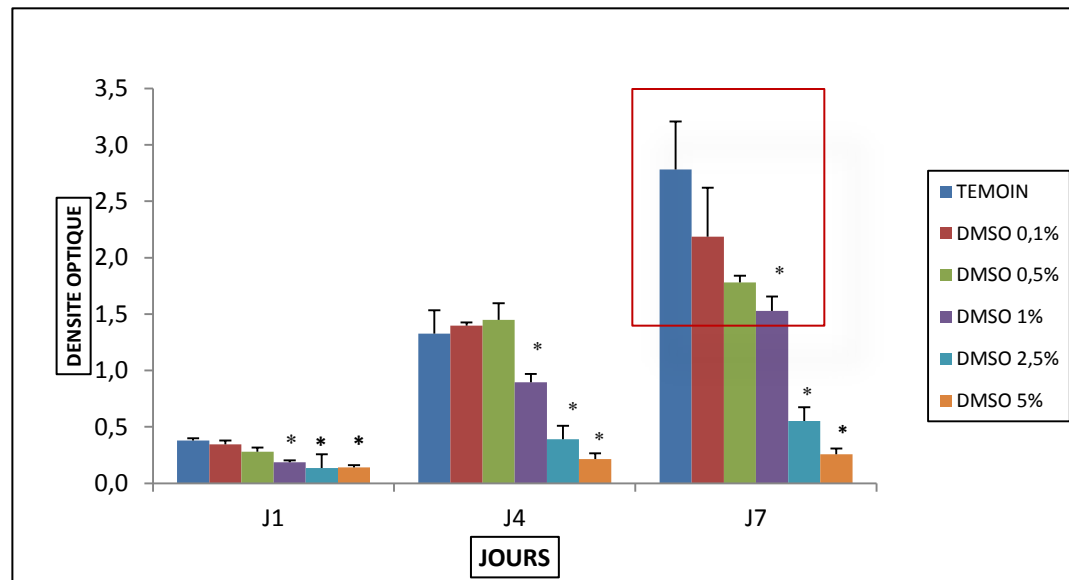
**Linéarité du MTT test**

**Journées Euro-Pharmat Tours - 14, 15 & 16 Octobre 2014**

# Résultats

14

## 3. Cytotoxicité du DMSO



\*  $p < 0.05$  % DMSO vs CTRL



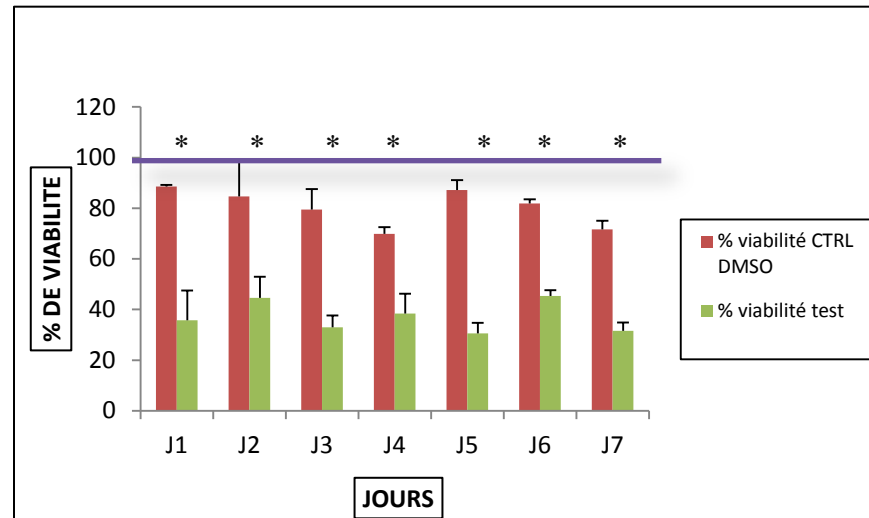
**Les pourcentages 0.1. 0.5 et 1% de DMSO ont été jugés compatibles avec la culture cellulaire**

**Journées Euro-Pharmat Tours - 14, 15 & 16 Octobre 2014**

# Résultats

15

## 4. Cytotoxicité des plastifiants et des métabolites



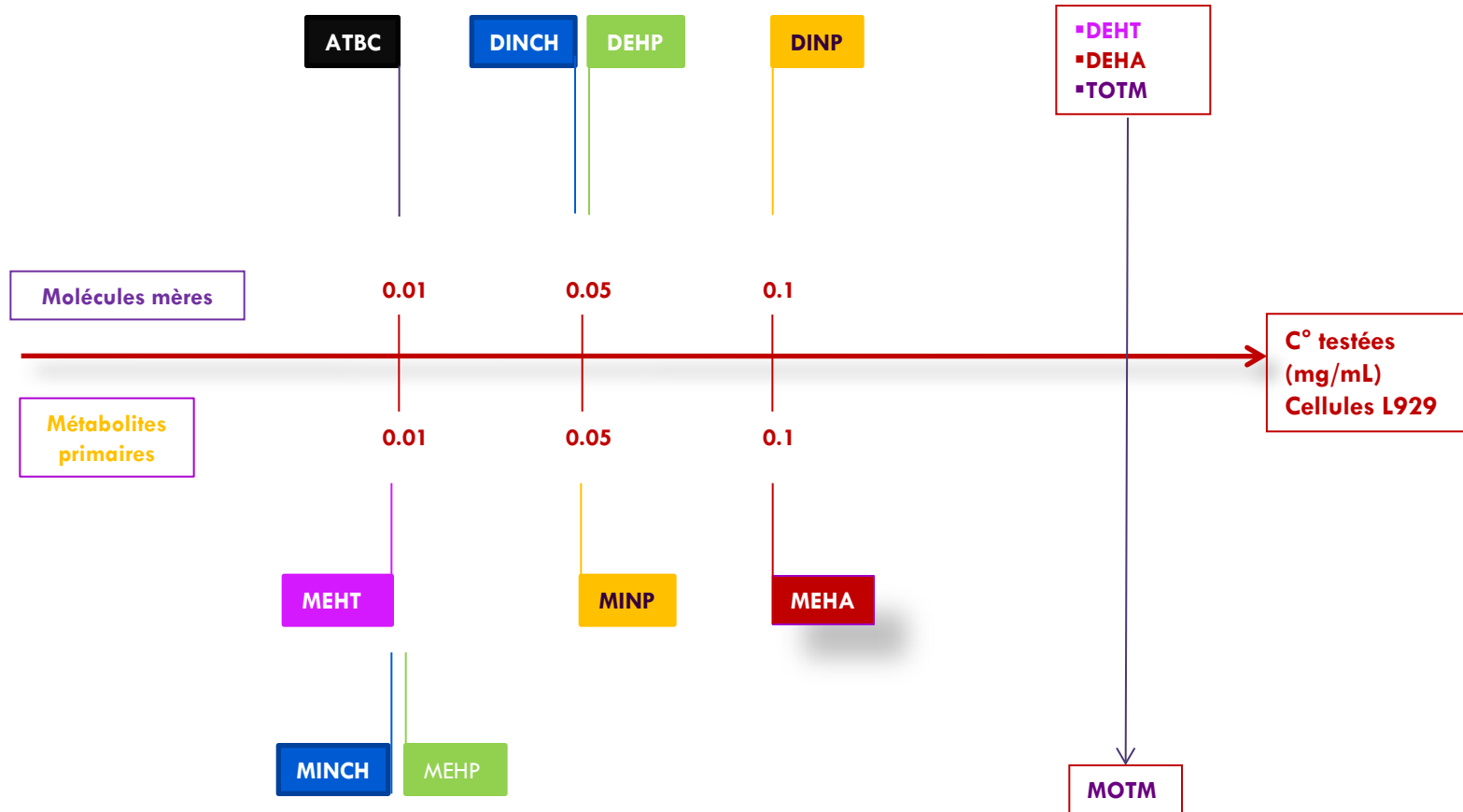
\*  $p < 0.05$  test vs contrôle DMSO

# Résultats

16

CYTOTOXIQUE

NON CYTOTOXIQUE



## Légende

■ DEHP → MEHP

■ DEHT → MEHT

■ DEHA → MEHA

■ DINP → MINP

■ DINCH → MINCH

■ TOTM → MOTM

■ ATBC



# Discussion et conclusion

17

- DEHA, TOTM, DEHT non toxiques
  - Pour les concentrations testées
- Métabolites entraînent une cytotoxicité
  - A l'exception du MOTM (TOTM)
- L'ATBC molécule la plus hydrosoluble (20 mg/mL) est la plus cytotoxique
  - Relation solubilité/cytotoxicité non confirmée pour les autres molécules
  - Influence de la structure chimique des molécules

# Discussion et conclusion

18

- ✓ Travail comparatif portant sur les plastifiants seuls
  - Littérature présente le plus souvent une évaluation des produits finis en PVC
  
- ✓ Difficulté de solubilisation des plastifiants à cause de leur lipophilie mais efficacité du DMSO
  - **Limite des travaux publiés** : les solutions mises au contact des DM ne décrochent pas toujours les plastifiants et ne permettent pas leur contact avec les cellules
  - **Limite de notre étude** : impossible de tester des concentrations en plastifiants  $>0.1$  mg/mL (1% de la solution mère) car toxicité du DMSO au-delà de ce pourcentage
  
- ✓ Certaines solutions administrées par les DM en PVC sont suffisamment hydrophobes pour décrocher les plastifiants

# Discussion et conclusion

19

- ✓ Etudes complémentaires sur d'autres lignées cellulaires nécessaires
  
- ✓ Résultats à corrélés à deux paramètres:
  - Les quantités de plastifiants potentiellement libérées du DM en clinique
  - La capacité de métabolisation in vivo des molécules mères (métabolites plus toxiques que les molécules mères)

## Conclusion:

On ne peut conclure sur la toxicité des dispositifs médicaux en PVC plastifiés par les plastifiants alternatifs au DEHP sur ces seuls tests de cytotoxicité. Cependant nous ne pouvons pas faire l'impasse sur l'évaluation des quantités relarguées.

Je vous remercie de votre attention



GRIIOT



Journées Euro-Pharmat Tours - 14, 15 & 16 Octobre 2014