UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Doctorale Energie Mécanique Matériaux

Institut Jean Lamour

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Intitulé du doctorat: « Science des Matériaux »

par

Cristina BACH CAMPA

EVALUATION DE LA MIGRATION DES CONSTITUANTS DE L'EMBALLAGE EN POLY(ETHYLENE TEREPHTALATE) (PET) VERS L'EAU, DES FACTEURS D'INFLUENCE ET DU POTENTIEL TOXIQUE DES MIGRATS

Date de soutenance: 14 Novembre 2011

Membres du Jury:

Brigitte JAMART, ENSIC	Présidente du jury
Patrick MAZELLIER, Université de Bordeaux	Rapporteur
Roland SEGUELA, Insa-Lyon	Rapporteur
Laurent DAVID, Université de Lyon 1	Examinateur
Isabelle SEVERIN, Université de Bourgogne	Examinateur
Marie-Christine CHAGNON, Université de Bourgogne	Co-directrice
Serge ETIENNE, IJL	Directeur
Xavier DAUCHY, ANSES-LHN	Invité

REMERCIEMENTS

Au cours de la rédaction de ce manuscrit, j'ai imaginé en de nombreuses occasions avec impatience le moment où j'écrirai cette page de remerciements, le soulagement de terminer ce long « parcours du combattant» et de tourner une page de ma vie (enfin libre!). Mais face à cette page blanche, je m'aperçois que l'effort consacré en méritait la peine et que j'ai eu la chance de travailler avec des personnes passionnées par ces disciplines scientifiques, qui m'ont conseillée durant ces trois années et surtout qui m'ont beaucoup apporté dans tous les sens du terme.

Tout d'abord, je tiens à remercier les différents membres du jury qui ont accepté de juger ce travail de recherche et en particulier, M. Roland SEGUELA et M. Patrick MAZELLIER pour être rapporteurs de cette thèse.

Je tiens à remercier Serge ETIENNE, Marie-Christine CHAGNON et Xavier DAUCHY, mes trois «*directeurs de thèse*» chacun dans leur domaine, pour la confiance qu'ils m'ont accordée. Sans votre soutien et implication cette thèse ne serait pas devenue une réalité. Serge, merci pour m'avoir tenu «*les mains et… aussi les pieds*», pour ta gentillesse et pour m'avoir guidée par tes conseils scientifiques et surtout pour être resté « *zen* » quand je ne l'étais pas du tout. Marie-Christine, merci de m'avoir accueillie dans ton équipe et pour nos discussions multiples et enrichissantes. Tu m'as apporté une aide précieuse. Xavier, nous avons parcouru un long chemin ensemble en partageant de très bons moments, mais également de moments difficiles et je te remercie d'avoir été toujours là. Travailler avec toi a été enrichissant et gratifiant scientifiquement parlant, mais surtout j'ai découvert un bon chef, une grande personne et surtout un ami.

Je remercie vivement les membres du comité de pilotage de cette thèse (C. TRICARD, A. NOVELLI, V. FESSARD et E. BARTHELEMY) pour m'avoir accordé leur temps, apporté des points des vues intéressants et l'intérêt qu'ils ont manifesté au cours de ces années pour mes travaux.

Je remercie l'ANSES pour avoir financé mes travaux et bien sûr, tous les membres du Laboratoire d'Hydrologie de Nancy où j'ai mené la majeure partie de ce travail. Je vous remercie tous pour la bonne ambiance et pour m'avoir intégrée dans votre équipe. Bien sûr, je tiens à remercier notre directeur Jean-François MUNOZ pour la confiance qu'il m'a accordée pour mener à bien ce projet. Je remercie tout spécialement l'unité chimie des eaux pour son soutien scientifique et aussi personnel. En particulier, Christelle (mon coach perso), Vivi, Agnès, Adeline, Caro, Marie-Christelle, Sophie et Vanessa des super «*coupines*». Merci pour avoir supporté mon humeur parfois changeant surtout pendant la rédaction.

Un grand merci à Damien et Adeline, l'équipe infernale des doctorants du LHN avec qui j'ai passé de longues journées, soirées et week-ends au laboratoire durant ces trois ans. Un énorme merci également au docteur Isabella, ma petite italienne préférée, avec qui j'ai partagé des rigolades, de bons et de moins bons moments.

Ma sincère reconnaissance à l'équipe 304 du département SI2M, à l'Ecole de Mines et en particulier à Abdesselam DAHOUN pour l'intérêt et son soutien pour mes travaux de recherche au cours de toutes ces années.

Je tiens aussi à adresser ma gratitude à Laurent DAVID pour la réalisation des essais au ESRF à Grenoble et pour m'avoir initié aux techniques d'interprétation des résultats de la diffraction des rayons X.

Je souhaite également remercier tous les membres du Laboratoire de Toxicologie Alimentaire d'AgroSup à Dijon, pour leur accueil et leur bonne humeur. Je suis tout particulièrement reconnaissante envers Coralie DUMONT et Isabelle SEVERIN.

Finalement, un grand merci à mes amis, à Guillaume et à ma famille, sans votre soutien, je n'aurais pas pu arriver au bout du tunnel.

Table des matières

REMERCIEMENTS ..... **I**

LISTE DES FIGURES ..... **IX**

LISTE DES TABLEAUX ..... **XIX**

ABREVIATIONS ..... **XXIII**

INTRODUCTION GENERALE **1**

CHAPITRE 1: INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **3**

1.1 LES INTERACTIONS EMBALLAGE / ALIMENT 3

1.1.1 La perméation *4*

1.1.2 La sorption *4*

1.1.3 La migration *4*

1.2 FONDEMENTS SUR LA MIGRATION POLYMERE / ALIMENTS 5

1.2.1 Diffusion du migrant à travers le polymère *5*

1.2.2 Solvatation dans l'interface polymère / aliment *5*

1.2.3 La dispersion de la molécule diffusante *6*

1.3 LES FACTEURS D'INFLUENCE SUR LA MIGRATION 6

1.3.1 La nature des constituants du polymère *6*

1.3.2 La nature et l'état du polymère *8*

1.3.3 La cristallinité du polymère dans l'emballage *8*

1.3.4 Le milieu au contact *9*

1.3.5 La température *9*

1.4 CADRE REGLEMENTAIRE EUROPEEN SUR LES MATERIAUX A ENTRER EN CONTACT AVEC LES DENREES ALIMENTAIRES 10

1.4.1 Directive 2002/72/CE *11*

1.4.2 Règlement No. 10/2011 ..... *13*

1.5 LES MIGRANTS POTENTIELS DES BOUTEILLES EN PET 15

1.5.1 Les monomères et catalyseurs *15*

1.5.2 Les produits de dégradation du PET *16*

1.5.3 Les additifs *18*

1.6 LES COMPOSES IDENTIFIES DANS LES EAUX EMBOUTEILLEES EN PET: UN BILAN.. 39

1.7 OBJECTIFS DE LA THESE 41

1.8 PROTOCOLE EXPERIMENTAL 42

1.8.1 Sélection des migrants potentiels *42*

1.8.2 Les méthodes d'analyse de l'eau *43*
1.8.3 Les méthodes de caractérisation physico-chimique du matériau PET. *43*
1.8.4 Les essais toxicologiques dans l'eau *44*
1.8.5 Sélection des couples eau / matériau *46*
1.8.6 Cinétiques de migration du PET vers l'eau *48*

CHAPITRE 2: LE MATERIAU PET POUR LE CONDITIONNEMENT DE L'EAU 49

2.1 LA SYNTHESE DU PET 50
2.2 MORPHOLOGIE ET STRUCTURE SEMI-CRISTALLINE DU PET 52
2.3 VIEILLISSEMENT DU PET 54
2.3.1 Vieillissement chimique du PET *54*
2.3.2 Vieillissement physique *59*
2.4 LA MISE EN FORME DE LA BOUTEILLE EN PET 61
2.4.1 Les propriétés mécaniques des bouteilles *63*
2.4.2 Les propriétés barrières des bouteilles *64*
2.5 LE RECYCLAGE DES BOUTEILLES EN PET 65
2.6 LES METHODES DE CARACTERISATION PHYSIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUES DU PET. 68
2.6.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) en réflexion totale atténué (ATR) *68*
2.6.2 L'enceinte de photo-vieillissement ARTACC® *68*
2.6.3 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) *70*
2.6.4 Spectrométrie mécanique à basse fréquence *71*
2.6.5 Diffraction de Rayons X (SAXS et WAXS). *72*
2.7 RESULTATS EXPERIMENTAUX 74
2.7.1 Spectres IRTF en mode ATR après exposition naturelle à la lumière solaire des bouteilles *74*
2.7.2 Spectres IRTF en mode ATR après vieillissement artificiel accélérée avec l'enceinte ARTACC® *76*
2.7.3 Résultats de l'analyse calorimétrique. *77*
2.7.4 Résultats de spectrométrie de relaxation mécanique à basse fréquence *80*
2.7.5 Résultats de la diffraction de rayons X en WAXS *82*
2.7.6 Résultats de la diffraction de rayons X en SAXS *87*

CHAPITRE 3: IDENTIFICATION DES MIGRANTS POTENTIELS DU PET VERS L'EAU..... 93

3.1 PRINCIPES DES METHODES ANALYTIQUES UTILISES POUR LA METHODE «SCREENING» 94
3.1.1 Les techniques de préparation *95*

3.1.2 L'extraction liquide-liquide (LLE) *96*
3.1.3 L'extraction sur phase solide (SPE) *96*
3.1.4 Les techniques d'analyse *99*
3.2 ELABORATION DU PROTOCOLE ANALYTIQUE DE BALAYAGE («SCREENING») DES COMPOSES ORGANIQUES DANS L'EAU EMBOUTEILLEE 104
3.2.1 Protocole LLE *105*
3.2.2 Protocole SPE *106*
3.2.3 Analyse qualitative en GC-MS *109*
3.3 SELECTION D'UN PANEL DE BOUTEILLES COMMERCIALES EN PET ET LES CONDITIONS D'EXPOSITION AU VIEILLISSEMENT ACCELERE 110
3.4 INTERPRETATION DES RESULTATS DE LA GC-MS 111
3.5 RESULTATS EXPERIMENTAUX 112
3.6 LA LISTE DE MIGRANTS POTENTIELS PRIS EN COMPTE DANS LA SUITE DE L'ETUDE 123
3.7 LA METHODE MULTI-RESIDUS DE DOSAGE DE 14 MOLECULES DANS L'EAU PAR GC-MS 125
3.7.1 Conditions opératoires *126*
3.7.2 La gamme d'étalonnage et les limites de quantification de la méthode *131*
3.7.3 Les rendements d'extraction dans l'eau qualité LC *131*
3.7.4 Contrôles pour la validation de la série d'échantillons *133*
3.8 LA METHODE DE DOSAGE DES COMPOSES CARBONYLES DANS L'EAU 135
3.8.1 Optimisation de la dérivation chimique des aldéhydes *136*
3.8.2 Optimisation de la SPE des aldéhydes-DNPH *138*
3.8.3 Analyse par HPLC/DAD *140*
3.8.4 Validation de la méthode d'analyse *140*
3.9 LA METHODE DE DOSAGE DES ELEMENTS INORGANIQUES DANS L'EAU 143
CHAPITRE 4: CINETIQUES DE MIGRATION DU PET VERS L'EAU 145
4.1 DESCRIPTION DES ECHANTILLONS SOUMIS AUX ESSAIS DE MIGRATION 146
4.2 CONDITIONS D'EXPOSITION A LA TEMPERATURE DE L'EAU EMBOUTEILLEE 147
4.3 CONDITIONS D'EXPOSITION A LA LUMIERE SOLAIRE DE L'EAU EMBOUTEILLEE 148
4.4 RESULTATS EXPERIMENTAUX SUR LA MIGRATION DES MOLECULES DETECTEES PAR LA METHODE DITE «SCREENING» DANS L'EAU EMBOUTEILLEE 150
4.4.1 Impact de la température *151*
4.4.2 Impact de l'exposition solaire *153*
4.5 RESULTATS EXPERIMENTAUX SUR LA MIGRATION DES ALDEHYDES DANS L'EAU EMBOUTEILLEE 154

4.5.1 Impact de la température *154*
4.5.2 Impact de l'exposition solaire *160*
4.5.3 Comparaison de l'effet température et l'effet exposition solaire sur la migration du formaldéhyde et acétaldéhyde. *165*
4.6 RESULTATS EXPERIMENTAUX SUR LA MIGRATION DES ELEMENTS INORGANIQUES DANS L'EAU EMBOUTEILLEE 166
4.6.1 Impact de la température *166*
4.6.2 Impact de l'exposition solaire *172*
4.6.3 Comparaison de l'effet température et l'effet exposition solaire sur la migration de l'antimoine *176*
4.7 COMPOSITION DES EAUX EMBOUTEILLEES DE LA MARQUE A ET B EN PET ET VERRE EXPOSEES AUX CONDITIONS MAXIMALES DE TEMPERATURE ET DE LUMIERE SOLAIRE . 177
CHAPITRE 5: ETUDE TOXICOLOGIQUE DES EAUX EMBOUTEILLEES EN PET 179
5.1 LES ECHANTILLONS D'ESSAI 182
5.2 TEST DE VITESSE DE SYNTHESE DE L'ARN 184
5.2.1 Matériel et méthodes *185*
5.2.2 Mode opératoire *186*
5.2.3 Interprétation et critères d'acceptation des résultats *187*
5.2.4 Résultats et Discussion *188*
5.3 TEST DE MUTATION REVERSE SUR DES BACTERIES (TEST D'AMES) 190
5.3.1 Matériel et méthodes *192*
5.3.2 Le système d'activation métabolique *194*
5.3.3 Conditions expérimentales *196*
5.3.4 Interprétation et validation des résultats *197*
5.3.5 Résultats et Discussion *198*
5.4 TEST DU MICRONOYAUX 201
5.4.1 Réactifs et produits *204*
5.4.2 Mode opératoire *204*
5.4.3 Traitement des résultats *205*
5.4.4 Interprétation et validation des résultats *206*
5.4.5 Résultats et Discussion *207*
5.5 LE POTENTIEL PERTURBATEUR ENDOCRINIEN 212
5.6 TEST DU POTENTIEL PERTURBATEUR ENDOCRINIEN ŒSTROGENIQUE 215
5.6.1 Matériel et méthodes *216*
5.6.2 Mode Opératoire *217*
5.6.3 Résultats expérimentaux *220*

5.7 TEST DU POTENTIEL PERTURBATEUR ENDOCRINIEN (ANTI)-ANDROGENIQUE... 227
5.7.1 Matériel et méthodes... *228*
5.7.2 Conditions Opératoires... *230*
5.7.3 Résultats expérimentaux... *231*
CONCLUSION GENERALE... **235**
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... **239**
ANNEXES ... **255**

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1: Transferts de matières emballage/aliment (Nielsen et Jägerstad, 1994) 3

Figure 1-2: Réaction de formation du diéthylène glycol à partir du PET (AFSSA, 2006)..... 17

Figure 1-3: Réaction de formation de l'acétaldéhyde (Konkol, 2004) 17

Figure 1-4: Réactions de cyclopolymérisation conduisant à la formation des oligomères (Naït-Ali, 2008) 18

Figure 2-1: Méthodes de synthèse du PET (Romão et al., 2009b) 50

Figure 2-2: Conformation *trans* et *gauche* du PET (Fechine *et al.*, 2002) 53

Figure 2-3: Arrangement triclinique du PET (Daubeny et Bunn, 1954; Picard, 2008) 53

Figure 2-4: Réaction de décomposition thermique du PET (Dzięciol et Trzeszczyński, 1998) 55

Figure 2-5: Schéma général des mécanismes de dégradation par oxydation (Verdu, 1990) .. 56

Figure 2-6: Dégradation thermo-oxydative du PET (Naït-Ali, 2008)..... 57

Figure 2-7: Dégradation par hydrolyse du PET (Naït-Ali, 2008) 58

Figure 2-8: Evolution de la morphologie du PET: préforme amorphe, bouteille élaborée par soufflage/étirage la même bouteille après un maintien à 110°C pendant 1 heure 60

Figure 2-9: Processus de fabrication des préformes (Marechal. E, 2002) 62

Figure 2-10: Mise en forme des bouteilles en PET (Chevalier *et al.*, 2001)..... 62

Figure 2-11: Enceinte de photo-vieillissement ARTACC® (http://www.stationdebandol.com) 69

Figure 2-12: Comparaison de l'irradiation entre l'exposition naturelle au soleil et l'enceinte de photo-vieillissement (http://www.stationdebandol.com) 69

Figure 2-13: Analyse calorimétrique d'un PET amorphe 70

Figure 2-14: Partie mécanique de l'instrument utilisé dans cette étude pour les mesures d'élasticité dynamique du PET 72

Figure 2-15: Illustration de la cristallisation d'un polymère à partir du liquide et la *Lp* (Etienne et David, 2002) 73

Figure 2-16: Dispositif expérimental utilisé sur la ligne D2AM (ESRF) pour les mesures de diffraction RX 74

Figure 2-17: Spectres IRTF-ATR avant (tracé rouge) et après 10 jours d'exposition à la lumière naturelle du soleil (tracé bleu) pour les bouteilles de la marque A 75

Figure 2-18: Spectres IRTF-ATR avant (tracé rouge) et après 10 jours d'exposition à la lumière naturelle du soleil (tracé bleu) pour les bouteilles de la marque B 75

Figure 2-19: Spectres IRTF-ATR avant (tracé rouge) et après 648 h de vieillissement artificiel accéléré (tracé bleu) pour les bouteilles de la marque A 76

Figure 2-20: Spectres avant (tracé rouge) et après 648 h de vieillissement artificiel accéléré (tracé bleu) pour les bouteilles de la marque B 76

Figure 2-21: Thermogramme du goulot de la bouteille en PET de la marque A lors de deux chauffages successifs..... 78

Figure 2-22: Thermogramme de la partie étirée de la bouteille en PET de la marque A lors de deux chauffages successifs..... 78

Figure 2-23: Thermogramme de la partie étirée de la bouteille en PET marque B lors du premier chauffage..... 79

Figure 2-24: Variation du coefficient tan(φ) et du module dynamique $|G^*|$ au cours de trois chauffages successifs mesurées à 0,3 Hz pour le PET des bouteilles de la marque A 80

Figure 2-25: Variation du coefficient tan(φ) et du module dynamique $|G^*|$ au cours de trois chauffages successifs mesurées à 1 Hz pour le PET des bouteilles de la marque A 81

Figure 2-26: Diffractogrammes RX grands angles (WAXS) pour la bouteille PET de la marque A obtenus à l'aide d'un détecteur bidimensionnel (*d* représente la distance de mesure sur l'échantillon)..... 83

Figure 2-27: Diffraction RX grands angles (WAXS) pour la bouteille de la marque A avec la position des raies caractéristiques du PET à chaque distance de mesure de l'échantillon. 84

Figure 2-28: Diffractogrammes RX grands angles (WAXS) pour la bouteille de la marque B obtenus à l'aide d'un détecteur bidimensionnel (*d* représente la distance de mesure sur l'échantillon) 85

Figure 2-29: Diffraction RX grands angles (WAXS) pour la bouteille de la marque B avec la position des raies caractéristiques du PET à chaque distance de mesure de l'échantillon. 86

Figure 2-30: Diffractogrammes RX petits angles (SAXS) pour la bouteille de la marque A obtenus à l'aide d'un détecteur bidimensionnel (*d* = représente la distance de mesure sur l'échantillon) 88

Figure 2-31: Diffraction RX petits angles (SAXS) pour la bouteille PET de la marque A. *Lp* est la distance de corrélation déduite de la position du maximum d'intensité diffractée *I(q)*. 89

Figure 2-32: Diffractogrammes RX petits angles (SAXS) pour la bouteille de la marque B obtenus à l'aide d'un détecteur bidimensionnel (*d* = représente la distance de mesure sur l'échantillon) 90

Figure 2-33: Diffraction RX petits angles (SAXS) pour la bouteille PET de la marque B. *Lp* est la distance de corrélation déduite de la position du maximum d'intensité diffractée *I(q)*. 91

Figure 3-1: Description d'une procédure d'extraction sur phase solide (SPE) d'après (Pichon, 2006; Gru, 2010) 97

Figure 3-2: Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse d'après Skoog *et al.* (1997)... 100

Figure 3-3: Schéma d'un injecteur-vaporisateur à température programmée utilisées pour cette étude, d'après Richardin (2001) 101

Figure 3-4: Schéma d'une trappe ionique à source externe d'après Bouchonnet (2009) 103

Figure 3-5: Schéma du protocole SPE 107

Figure 3-6: Chromatogramme correspondant à l'eau embouteillée plate de la marque A après 15 jours de vieillissement accéléré dans les conditions indiquées traitée par LLE et analysée par GC-MS 112

Figure 3-7: Chromatogramme correspondant à l'eau embouteillée plate de la marque A après 15 jours de vieillissement accéléré dans les conditions indiquées et traitée par SPE et analysée par GC-MS 112

Figure 3-8: Nombre de bouteilles dans lesquelles ont été détectées chacune des molécules, listées dans le tableau 3-4, après extraction par LLE à *t = 0 jour* et *t = 15 jours*..... 114

Figure 3-9: Nombre de bouteilles dans lesquelles ont été détectées chacune des molécules, listées dans le tableau 3-4, après extraction par SPE à *t = 0 jour* et *t = 15 jours* 114

Figure 3-10: Structure chimique des composés relatifs aux antioxydants détectés dans l'eau embouteillée en PET: (a) 2,6-di-*tert*-butyl-benzoquinone, (b) 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione, (c) 2,4-di-*tert*-butylphénol, (d) 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldéhyde, (e) 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphénol (BHT), (f) methyl 3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) propionate, (g) 4-nonylphénol 117

Figure 3-11: Structure chimique des stabilisants UV détectés dans l'eau embouteillée en PET: (a) benzophénone, (b) oxybenzone, (c) 2-ethylhexyl salycilate, (d) 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate, (e) ethyl-4-ethoxybenzoate 119

Figure 3-12: Structure chimique des plastifiants détectés dans l'eau embouteillée en PET: (a) phtalate de diméthyle (DMP), (b) phtalate de diéthyle (DEP), (c) phtalate de dibutyle (DBP), (d) phtalate de disobutyle (DIBP), (e) phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP) , (f) adipate de di-2-éthylhexyle (DEHA) 120

Figure 3-13: Structure chimique des composés volatils détectés dans l'eau embouteillée en PET: (a1) *orto*-xylène, (a2) *meta*-xylène, (a3) *para*-xylène, (b) styrène, (c) isopropylbenzène, (d) isophtaldéhyde, (e) limonène 122

Figure 3-14: Structure chimique de l'érucamide 123

Figure 3-15: Dispositif d'extraction SPE 127

Figure 3-16: Réaction de dérivation des aldéhydes avec le 2,4-DNPH (Van Leeuwen *et al.*, 2004) 136

Figure 3-17: Suivi de la dérivation chimique des aldéhydes au cours du temps à 55°C avec un excès molaire de 2,4-DNPH (50 fois) 137

Figure 3-18: Moyenne des rendements d'extraction (n=3) obtenus avec les cartouches Oasis HLB et C18 Sep-Pak 139

Figure 4-1: Schéma du groupe d'échantillons testés pour évaluer l'influence de l'exposition solaire et la température sur la migration 146

Figure 4-2: Exposition solaire des bouteilles des marques A et B en PET et verre à la station de vieillissement naturel de Bandol (83) 148

Figure 4-3: Profil de températures de l'EUP dans la bouteille en PET de la marque A 150

Figure 4-4: Concentrations de 2,4-di-*tert*-butylphénol (µg/L) dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure conditionnées dans des bouteilles PET et verre de la marque A. Les concentrations représentées sont la moyenne de 5 et 4 réplicats pour l'eau plate et l'eau ultrapure, respectivement. La limite de quantification (LQ) pour le 2,4-di-*tert*-butylphénol est 0,3 µg/L 151

Figure 4-5: Concentrations de 2,4-di-tert-butylphénol (µg/L) dans l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure conditionnées dans des bouteilles PET et verre de la marque B. Les concentrations représentées sont la moyenne de 5 et 4 réplicats pour l'eau plate et l'eau ultrapure, respectivement. La limite de quantification (LQ) pour le 2,4-di-tert-butylphénol est 0,3 µg/L 152

Figure 4-6: Concentrations de formaldéhyde (µg/L) dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure conditionnée dans des bouteilles en PET de la marque A exposées pendant 10 jours à différentes températures. La limite de quantification (LQ) de la méthode est 3,5 µg/L 155

Figure 4-7: Concentrations d'acétaldéhyde (µg/L) dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure conditionnée dans des bouteilles en PET de la marque A exposées pendant 10 jours à différentes températures. La limite de quantification (LQ) de la méthode est 2 µg/L... 155

Figure 4-8: Concentrations du formaldéhyde (µg/L) dans l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure conditionnée dans des bouteilles en PET de la marque B après 10 jours d'exposition à différentes températures 157

Figure 4-9: Concentrations d'acétaldéhyde (µg/L) dans l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure conditionnée dans des bouteilles en PET de la marque B après 10 jours d'exposition à différentes températures. 158

Figure 4-10: Cinétique de migration de l'acétaldéhyde dans une eau de source légèrement gazeuse (a) et le même type d'eau fortement gazeuse (b) à température ordinaire et à 40°C pendant 45 jours (Bach *et al.* 2010) 159

Figure 4-11: Concentrations du formaldéhyde dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure conditionnée dans des bouteilles en PET de la marque A exposées pendant 2, 6 et 10 jours à la lumière solaire. La limité de quantification(LQ) de la méthode d'analyse est 3,5 µg/L 160

Figure 4-12: Concentrations d'acétaldéhyde dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure conditionnée dans des bouteilles en PET de la marque A exposées la lumière solaire au cours du temps. La limite de quantification (LQ) de la méthode d'analyse est 2 µg/L . 161

Figure 4-13: Concentrations de formaldéhyde (µg/L) dans l'eau gazeuse et l'eau ultrapure conditionnées dans des bouteilles en PET de la marque B au cours du temps à la lumière solaire. La limite de quantification (LQ) de la méthode d'analyse est 3,5 µg/L..... 163

Figure 4-14: Concentrations d'acétaldéhyde (µg/L) dans l'eau gazeuse et l'eau ultrapure conditionnées dans des bouteilles en PET de la marque B au cours du temps par action de la lumière solaire. La limite de quantification (LQ) de la méthode est 2 µg/L 164

Figure 4-15: Cinétique de migration de l'acétaldéhyde à température ordinaire et à 40°C durant 45 jours dans l'eau minérale plate gazeuse conditionnée dans une bouteille tricouche (PET-PA-PET) (Bach, C. *et al*. 2010)..... 165

Figure 4-16: Concentrations d'antimoine (µg/L) dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure conditionnées dans les bouteilles en PET de la marque A après 10 jours d'exposition dans de conditions contrôlées à différentes températures. L'exposition à température ordinaire a été fixée arbitrairement à 20°C. La LQ de l'antimoine est 0,2 µg/L 169

Figure 4-17: Concentrations d'antimoine (µg/L) dans l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure conditionnées dans les bouteilles en PET de la marque B après 10 jours d'exposition dans de conditions contrôlées à différentes températures. L'exposition à température ordinaire a été fixée arbitrairement à 20°C. La LQ de l'antimoine est 0,2 µg/L 169

Figure 4-18: Comparaison des teneurs d'antimoine dans l'eau ultrapure (EUP) conditionnée dans les bouteilles des marques A et B après 10 jours d'exposition à différentes températures. Les mesures sont les résultats de 5 réplicats pour chaque température... 171

Figure 4-19: Evolution de la concentration d'antimoine pour l'eau minérale plate et l'eau ultrapure dans les bouteilles de la marque A en fonction du temps d'exposition solaire. La moyenne de concentration a été calculée à partir de 5 réplicats pour chaque temps d'exposition..... 173

Figure 4-20: Evolution de la concentration d'antimoine pour l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure dans les bouteilles de la marque B en fonction du temps d'exposition solaire. La moyenne de concentration a été calculée à partir de 5 réplicats pour chaque temps d'exposition..... 174

Figure 4-21: Comparaison des concentrations d'Sb dans l'eau ultrapure conditionnée dans les bouteilles de la marque A et B en fonction du temps d'exposition solaire. La LQ de la méthode d'analyse pour l'antimoine est 0,2 µg/L. La moyenne de concentration a été calculée à partir de 5 réplicats 175

Figure 5-1: Cellules HepG2 utilisées pour cette étude 185

Figure 5-2: Exemple de représentation graphique de la détermination de la vitesse de synthèse d'ARN pour le méthylméthane sulfonate 187

Figure 5-3: Pourcentage de synthèse d'ARN obtenu pour les extraits testés par rapport au témoin négatif (Valentin *et al.*, 2001b) 188

Figure 5-4: Illustration de la mise en évidence de la réversion de la mutation sur des bactéries d'après Madigan et Martinko (2007) 191

Figure 5-5: Exemple de micronoyau observé dans une cellule binucléée. 202

Figure 5-6: Représentation des deux mécanismes de formation des micronoyaux, conséquences d'effets clastogènes et d'effets aneugènes, d'après Fenech (2000) et Foltete (2010) 202

Figure 5-7: Exemple de cellules HepG2 colorées par l'orange d'acridine 205

Figure 5-8: Résultats obtenus dans le test du micronoyau sur la lignée cellulaire HepG2 avec les extraits des eaux embouteillées des marques A et B en bouteille PET et verre après 10 jours d'exposition à la lumière solaire et 10 jours d'exposition à une température de 60°C 207

Figure 5-9: Disposition du milieu de traitement dans la microplaque avec les cellules HepG2 transfectées 219

Figure 5-10: Activités transcriptionnelles des différents extraits de l'eau exposée à 60°C pendant 10 jours liés au récepteur ERα. Les cellules HepG2 transfectées transitoirement par ERα et ERE-TK-Luc sont traitées aux concentrations indiquées pendant 24h. L'activité maximale (100%) correspond à l'activité obtenue avec du 14β-œstradiol (E2) à la concentration 0,1 nM (environ 4 200 000 cps). L'activité transcriptionnelle des extraits et du contrôle négatif, acétate d'éthyle (AE) à 0,25 % dans le milieu, a été calculée par rapport au contrôle positif (E2). Le signe * indique des résultats statistiquement différents du témoin. Les valeurs représentées sont les moyennes de trois expériences indépendantes (3 puits par concentration) 221

Figure 5-11: Activités transcriptionnelles des différents extraits de l'eau exposée à la lumières solaire pendant 10 jours liés au récepteur ERα. Les cellules HepG2 transfectées transitoirement par ERα et ERE-TK-Luc sont traitées aux concentrations indiquées pendant 24 h. L'activité (100%) correspond à l'activité obtenue avec le 17β-œstradiol (E2) à la concentration 0,1 nM (environ 4 200 000 cps). L'activité transcriptionnelle des extraits et du contrôle négatif (AE) à 0,25% dans le milieu, a été calculée par rapport au contrôle positif (E2). Le signe * indique des résultats statistiquement différents du témoin. Les valeurs représentées sont les moyennes de trois expériences indépendantes (3 puits par concentration)..... 222

Figure 5-12: Cellules MDA-MB453-kb2 utilisées pour la réalisation des essais d'activité transcriptionnelle du potentiel (anti)-androgénique 229

Figure 5-13: Activés transcriptionnelles des différents extraits de l'eau embouteillée exposée à 60°C pendant 10 jours liées au récepteur aux androgènes. Les cellules sont traitées aux concentrations indiquées pendant 24h. L'activité maximale (100%) correspond à l'activité obtenue avec la DHT à la concentration de 0,4 nM (environ 24 000 cps). Les signes * indiquent des résultats statistiquement différents du témoin DHT. Les valeurs représentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes (3 puits par concentration)..... 231

Figure 5-14: Activité transcriptionnelle liées au récepteur des androgènes de l'extrait d'eau gazeuse embouteillée en PET de la marque B. Les cellules sont traitées aux concentrations indiquées pendant 24 h. L'activité maximale (100%) correspond à l'activité obtenue avec la DHT à la concentration de 0,4 nM (environ 24 000 cps.). Les signes * indiquent des résultats statistiquement différents du témoin DHT 232

Figure 5-15: Activés transcriptionnelles des différents extraits d'eau exposée à la lumière solaire pendant 10 jours liées au récepteur aux androgènes. Les cellules MDA-MB453-kb2 sont traitées aux concentrations indiquées pendant 24h. L'activité maximale (100%) correspond à l'activité obtenue avec la DHT à la concentration de 0,4 nM (environ 24 000 cps). Les signes * indiquent des résultats statistiquement différents du témoin DHT. Les valeurs représentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes (3 puits par concentration)..... 233

Figure 5-16: Activité transcriptionnelle liées au récepteur des androgènes de l'extrait d'eau gazeuse embouteillée en PET de la marque B. Les cellules sont traitées aux concentrations indiquées pendant 24 h. L'activité maximale (100%) correspond à l'activité obtenue avec la DHT à la concentration de 0,4 nM (environ 24 000 cps.) Les signes * indiquent des résultats statistiquement différents du témoin DHT 234

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1: Catégories des migrants potentiels emballage/aliment classifiées selon leur poids moléculaire d'après Feigenbaum *et al.* (1993) 7

Tableau 1-2: Informations toxicologiques demandées par l'EFSA pour l'évaluation des substances utilisées dans les matériaux à contact alimentaire (EFSA, 2005) 11

Tableau 1-3: Caractéristiques physico-chimiques de l'eau embouteillée et des bouteilles PET employées pour cette étude 47

Tableau 2-1: Propriétés physiques du PET amorphe isotrope et de la phase cristalline (Etienne et David, 2002) 63

Tableau 2-2: Quelques propriétés du PET amorphe et du PET semi-cristallin (Nait-Ali 2008) 63

Tableau 2-3: Coefficient de perméation du PET à 30°C (10^{14} P cm^2 s^{-1} Pa^{-1}) (Elias, 1993) .. 64

Tableau 2-4: Taux de cristallinité et nature chimique des bouchons pour un panel des bouteilles en PET 77

Tableau 3-1: Exemples des différents adsorbants polymériques pour l'extraction en phase solide (Fontanals *et al.*, 2005) 99

Tableau 3-2: Programmation de la température de l'injecteur PTV et du four 109

Tableau 3-3: Panel des bouteilles utilisées pour les essais de vieillissement accéléré 110

Tableau 3-4: Liste de composés détectés dans les eaux embouteillées en PET après vieillissement accélérée des bouteilles (continue à la page suivante) 115

Tableau 3-5: Liste de substances d'intérêts pour la suite de l'étude..... 124

Tableau 3-6: Programmation de température du four pour la séparation chromatographique 129

Tableau 3-7: Molécules dosées par la présente méthode avec leurs fragments en masse 130

Tableau 3-8: Moyenne de rendements d'extraction obtenue dans l'eau qualité LC..... 132

Tableau 3-9: Rendements des dopages dans l'eau plate et l'eau gazeuse 134

Tableau 3-10: Molécules dosées avec la présente méthode..... 135

Tableau 3-11: Gradient d'élution pour la séparation chromatographique 140

Tableau 3-12: Domaine de la gamme d'étalonnage et limites de quantification de la méthode de dosage des 11 aldéhydes dans l'eau 141

Tableau 3-13: Limites et isotopes de quantification des éléments inorganiques dosées avec la présente méthode 143

Tableau 4-1: Conditions d'exposition à la température des bouteilles en PET et en verre des marques A et B 147

Tableau 4-2: Conditions d'exposition à la lumière des bouteilles en PET et verre 149

Tableau 4-3: Suivi des températures de l'eau EUP dans les bouteilles en PET au cours du transport et de l'exposition solaire 149

Tableau 4-4: Concentrations de formaldéhyde et acétaldéhyde dans l'eau ultrapure (EUP) après 10 jours d'exposition solaire et après 10 jours à température ordinaire, à 40°C et à 60°C à l'abri de la lumière solaire 166

Tableau 4-5: Concentrations des éléments inorganiques dans l'eau plate embouteillée en PET et verre à t = 0 *jour* et après 10 jours d'expositions à 60°C dans des conditions contrôlées (*t = 10 jours*). Les concentrations ont été obtenues en calculant la moyenne de 5 réplicats 167

Tableau 4-6: Concentrations des éléments inorganiques dans l'eau gazeuse embouteillée en PET et verre à t = 0 *jour* et après 10 jours d'expositions à 60°C dans des conditions contrôlées (*t = 10 jours*). Les concentrations ont été obtenues en calculant la moyenne de 5 réplicats 167

Tableau 4-7: Concentrations des éléments inorganiques dans l'eau plate embouteillée en PET et verre à t = 0 *jour* et après 10 jours d'expositions solaire dans des conditions contrôlées (*t = 10 jours*). Les concentrations ont été obtenues en calculant la moyenne de 5 réplicats 172

Tableau 4-8: Concentrations des éléments inorganiques dans l'eau gazeuse embouteillée en PET et verre à t = 0 *jour* et après 10 jours d'expositions solaire dans des conditions contrôlées (*t = 10 jours*). Les concentrations ont été obtenues en calculant la moyenne de 5 réplicats 172

Tableau 4-9: Concentrations de Sb dans l'eau ultrapure (EUP) après 10 jours d'exposition solaire et après de 10 jours à température ordinaire (20°C), à 40°C et à 60°C à l'abri du soleil 176

Tableau 4-10 : Concentrations des molécules trouvées dans les eaux embouteillées en PET et verre de la marque A et B après 10 jours d'exposition à 60°C 177

Tableau 4-11: Concentrations des molécules trouvées dans les eaux embouteillées en PET et verre de la marque A et B après 10 jours d'exposition à la lumière du soleil..... 177

Tableau 5-1: Extraits en acétate d'éthyle des eaux embouteillées en PET et verre après exposition utilisés pour l'étude du potentiel toxique 184

Tableau 5-2: Génotype spécifique des souches TA98 et TA100..... 192

Tableau 5-3: Composition du système d'activation métabolique (S9 mix)..... 194

Tableau 5-4: Principales caractéristiques des témoins positifs pour les souches TA98 et TA100 en absence et en présence de S9 195

Tableau 5-5: Résultats des essais de cytotoxicité de l'acétate d'éthyle sur la souche TA100 en absence et en présence du système d'activation métabolique S9..... 198

Tableau 5-6: Résultats des extraits des eaux embouteillées en PET et en verre exposés à la lumière solaire pendant 10 jours 199

Tableau 5-7: Résultats des extraits des eaux embouteillées en PET et en verre étuvés à 60°C pendant 10 jours 200

Tableau 5-8: Molécules à caractère perturbateur endocrinien susceptibles d'être trouvés dans les denrées alimentaires (Dumont, 2010) 213

Tableau 5-9: Réactifs et produits chimiques utilisés pour la réalisation du test du potentiel perturbateur endocrinien œstrogénique 216

Tableau 5-10: Réactifs et produits chimiques utilisés pour la réalisation des tests du potentiel perturbateur endocrinien (anti)-androgénique..... 228

ABREVIATIONS

AANE: Acides aminés non essentiels.
AcCN: Acétonitrile.
ADN: Acide désoxyribonucléique.
AFSSA: Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Aliments.
AFNOR: Agence Française de Normalisation.
AR: Récepteur humain aux androgènes.
ARN: Acide ribonucléide.
ATR: Réflexion totale atténuée.
BHT : Hydroxytoluène butyle.
BPA : Bisphénol A.
BPF : Bisphénol F.
CE : Commission Européenne.
CEE : Communauté Économique Européenne.
CEN : Comité Européen de Normalisation.
CPRG : Chlorophenol-red-β-d-galactopyranoside.
D : Coefficient de diffusion.
DBP : Phtalate de dibutylé.
DEG : Diethylène glycol.
DEP : Phtalate de Diéthyle.
DEHA : Adipate de di-2-ethylhexyle.
DEHP : Phtalate de di-2-éthylhexyle.
DGS : Direction Générale de la Santé.
DJT : Dose Journalière Tolérable.
DHT : Dihydrotestostérone.
DIBP : Phtalate de disobutyle.
DMP : Phtalate de diméthyle.
DMSO: Diméthylsulfoxyde.
DSC : Calorimétrie différentielle à balayage.
ECCAC: European Collection of Cell Cultures.
ECVAM: Centre européen pour la validation de méthodes alternatives.
EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments.
EVOH: Copolymère d'alcool vinyl éthylène.
GC: Chromatographie en phase gazeuse.
MS: Spectrométrie de masse.
HPLC/DAD: Chromatographie Liquide Haute Performance avec détecteur à barrettes de Diodes
ICP/MS: Spectrométrie de masse couplée à un plasma Inductif.
ICPS : International program on chemical safety.
IM: Indice de mutation.
IRTF: Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier.

LC-MS: Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.
LLE: Extraction Liquide/Liquide.
LMG: Limite de Migration Globale.
LMS: Limite de Migration Spécifique.
LQ: Limite de Quantification.
MEM: Minimum Essentiel Medium.
MeOH: Méthanol.
MMTV: Mouse Mammary Tumor Virus.
MSTFA: N-methy-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide.
Nil: Nilutamide
NIAS: Non-intentionally added substances.
OCDE: Organisation de coopération et de développement économiques.
PA: Polyamide.
PC: Polycarbonate.
PE: Polyéthylène.
PEHD: Polyéthylène Haute Densité.
PM: Poids moléculaire.
PP: Polypropylène.
PS: Polystyrène.
PVC: Polychlorure de Vinyle.
SDS: Dodécylsulfate de sodium.
SPE: Extraction en phase solide.
SPME: Micro-extraction en phase solide
SBSE: Extraction en phase solide par agitation d'un barreau adsorbant.
SODIS: Solar water désinfection.
SVF: Sérum de veau fœtal.
TNPP: Tris(nonylphenyl)phosphite.
Tf: Température de fusion.
Tg: Température de transition vitreuse.

INTRODUCTION GENERALE

Le poly(éthylène téréphtalate) (PET) est largement utilisé comme emballage dans l'industrie alimentaire, plus spécialement pour les conditionnements des eaux. Les eaux conditionnées se répartissent en deux catégories : les eaux minérales naturelles et les eaux de source. Ces deux types d'eau sont d'origine souterraine. Cependant, les eaux minérales se distinguent des eaux de source par leur teneur en certains constituants minéraux, la stabilité de leur composition et leur pureté originelle qui leur confèrent des effets bénéfiques pour la santé. Selon *les Chambres Syndicales des eaux minérales et des eaux sources*, la France est le deuxième consommateur mondial d'eaux minérales naturelles en bouteille avec une consommation annuelle moyenne estimée à 142 litres/habitant en 2006. Tandis que la consommation d'eaux de source est estimée à 47 litres/habitant/an en 2009.

Depuis le début des années 80, le PET a progressivement remplacé d'autres matériaux (le polychlorure de vinyle et le verre) utilisés pour le conditionnement des eaux dans la grande distribution. L'utilisation de ce polymère a été privilégiée compte tenu de ses propriétés physiques comme la transparence, la légèreté, l'étanchéité au gaz et sa faculté de recyclage. L'évaluation de l'inertie des matières plastiques au contact des denrées alimentaires, comme le PET, est régie par une réglementation européenne complète et spécifique qui permet d'assurer la sécurité sanitaire du matériau. Cependant, plusieurs études ont montré la présence des substances (phtalates, traces métalliques, alkylphenols, etc.) dont l'origine est controversée. Une hypothèse possible pour expliquer leur présence est la migration des constituants du PET (monomères, additifs et des NIAS en anglais *Non- Intentionally Added Substances*) vers l'eau embouteillée. De plus, certains auteurs ont rapporté une activité cyto / génotoxique et perturbateur endocrinien *in vitro* de l'eau embouteillée, ce qui a généré des doutes à propos de la qualité et la sureté du PET. Ces auteurs ont attribué ces réponses positives à un effet « cocktail » dans l'eau des bouteilles en PET. Cependant, les données apportées par les différentes études sont difficilement comparables entre elles et parfois apportent des conclusions contradictoires.

Il est apparu nécessaire d'obtenir des informations plus comparables et fiables en reliant la composition des mélanges chimiques présents dans l'eau à l'issue de la migration de l'emballage PET et de potentiels effets toxicologiques, afin de conclure à une évaluation des risques sur la santé humaine. La réalisation d'une étude globale en associant plusieurs disciplines (chimie analytique, physique des polymères et toxicologie) fait donc l'objet du présent travail, afin de préciser les facteurs d'influence de la migration, la composition des migrats et le potentiel toxique de ceux-ci. L'objectif est d'apporter une vision globale de la problématique de la migration depuis le PET vers l'eau, en prenant en compte un maximum de paramètres. L'objectif est également d'anticiper sur les questions de sécurité sanitaire qui émergent régulièrement à l'occasion de la publication d'articles aux données inquiétantes.

Chapitre 1: INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 LES INTERACTIONS EMBALLAGE / ALIMENT

Les emballages alimentaires sont rarement inertes. L'interaction entre le contenant et le contenu peut aboutir à des transferts de matière. Ces phénomènes sont susceptibles d'altérer la qualité de l'aliment, de détériorer les propriétés mécaniques de l'emballage et de causer des problèmes toxicologiques (Konkol, 2004). Trois types d'interactions sont possibles entre l'emballage et l'aliment : la perméation, la sorption et la migration. Ces trois types de phénomènes sont illustrés dans la figure 1-1.

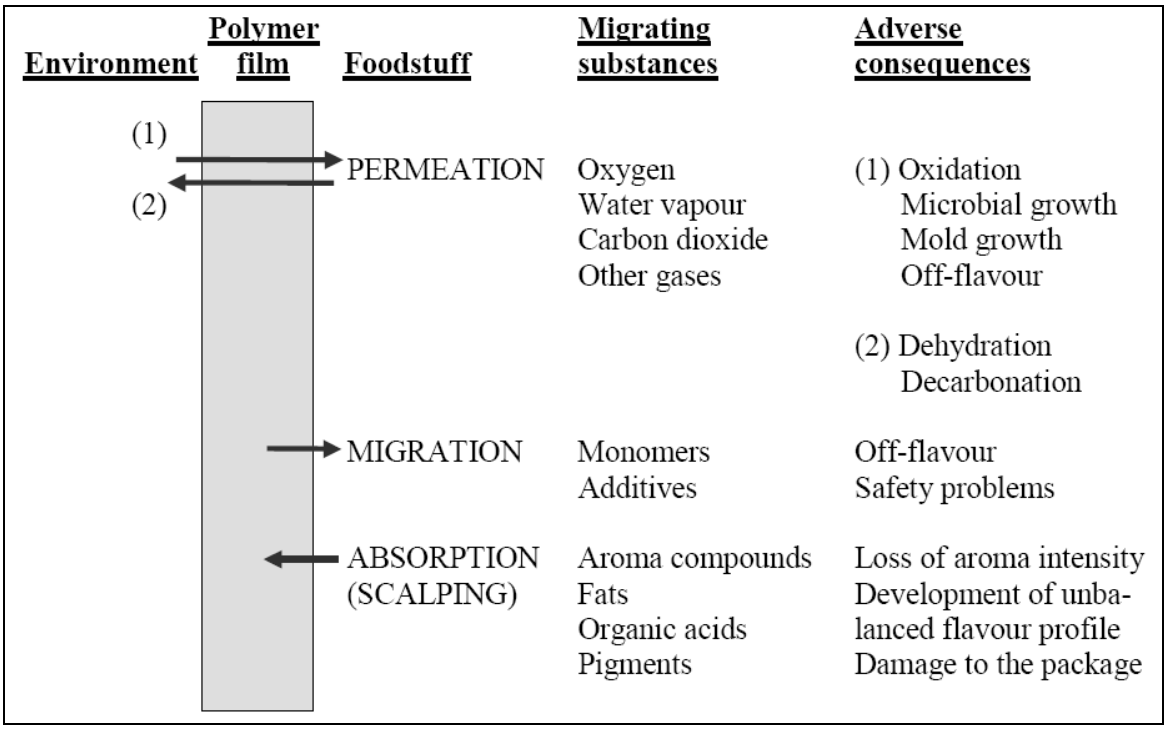


Figure 1-1: Transferts de matières emballage/aliment (Nielsen et Jägerstad, 1994)

1.1.1 La perméation

La perméation se caractérise par le transfert de gaz à travers l'emballage, notamment l'O_2 vers l'aliment, le CO_2 vers l'extérieur de l'emballage et le passage des composés volatils de l'extérieur vers l'aliment. Ce phénomène doit être réduit afin d'éviter la prolifération des bactéries dans l'aliment, les pertes de carbonatation dans les boissons gazeuses, la perte des arômes ou de flaveur dans le produit fini. En effet, les propriétés organoleptiques des aliments résultent d'un équilibre entre les composés volatils qui sont susceptibles de se transférer du produit vers l'extérieur (perte d'arômes) et les substances susceptibles de passer de l'extérieur vers l'aliment (contamination de produit) (Feigenbaum *et al.*, 1993; Konkol, 2004; Zaki, 2008; Severin *et al.*, 2011).

Dans le chapitre 2, la perméation et les propriétés barrières des bouteilles en PET seront traitées plus en détail.

1.1.2 La sorption

La sorption est l'assimilation des constituants de l'aliment par la paroi l'emballage plastique suivie de leur pénétration dans le polymère. Le processus de sorption peut induire une perte des arômes de l'aliment et entraîner une modification structurale du polymère (Severin *et al.*, 2011). En effet, le vieillissement irréversible du polymère peut être induit par des modifications de la structure chimique des chaînes macromoléculaires et de son état physique (Verdu, 1990; Zaki, 2008). Les phénomènes de sorption sont plus fréquents avec des composés lipophiles, cela est dû à la grande affinité pour la plupart des emballages qui sont aussi peu ou pas polaires (PE, PET, PS, PP) (Feigenbaum *et al.*, 1993). De plus, si le matériau plastique est recyclé ou réutilisé comme emballage destiné au contact alimentaire, les composés étrangers absorbés dans le polymère sont des éventuels migrants (Sax, 2010).

1.1.3 La migration

La migration des constituants de l'emballage (monomères résiduels, additifs, néoformés, etc.) vers le produit conditionné est un autre type d'échange de matière qui constitue un problème de sécurité alimentaire. Dans la présente étude, nous allons nous intéresser à ce phénomène exclusivement pour les bouteilles en PET utilisées pour le conditionnement de l'eau. Dans la section suivante, les fondements de la migration polymère/aliment seront détaillés et ensuite, concrétisés pour l'emballage PET.

1.2 FONDEMENTS SUR LA MIGRATION POLYMERE / ALIMENTS

La migration peut se définir comme le transfert de matière d'une source externe vers l'aliment. De façon générale, ce transfert de matière peut se produire pendant la production, le transport, le stockage, la cuisson ou même pendant la consommation de l'aliment (Simoneau, 2008). Le processus de migration de l'emballage polymérique vers le produit fini peut être décrit en trois étapes étroitement liées entre elles. Ces étapes sont les suivantes (Lau et Wong, 2000):

- La diffusion du migrant à travers le polymère gouvernée par le coefficient de diffusion (*D*).
- La solvatation de l'interface polymère/aliment contrôlée par le coefficient de partage (*K*).
- La dispersion de la molécule diffusante dans l'aliment qui dépend de la solubilité et du coefficient de diffusion.

1.2.1 Diffusion du migrant à travers le polymère

Le coefficient de diffusion (*D*) représente la vitesse de migration d'une substance à travers chaque phase. La migration des substances dans les systèmes polymère/aliment peut être modélisée par la deuxième loi de Fick suivant l'équation 1-1:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x}\left(D\frac{\partial C}{\partial x}\right) \qquad (1\text{-}1)$$

Où *C* est la concentration du composé diffusant, *x* est la position dans le matériau et *t* est le temps.

1.2.2 Solvatation dans l'interface polymère / aliment

Le coefficient de partage est l'équilibre thermodynamique entre les deux phases aliment /polymère. Le coefficient de partage (*K*) de chaque migrant est défini par le ratio entre la concentration en équilibre dans le polymère (C_p) et dans l'aliment (C_s), représenté par l'équation 1-2:

$$K = \frac{C_p}{C_s} \qquad (1\text{-}2)$$

En termes de sécurité alimentaire, même si une valeur de *K* élevée limite la migration de substances de l'emballage vers l'aliment, il est souhaitable d'avoir des coefficients de partition bas pour éviter la perte de arômes et le goût des aliments conditionnés (Tehrany et Desobry, 2004).

1.2.3 La dispersion de la molécule diffusante

Selon Lau et Wong (2000), au-delà de l'interface du polymère, les molécules se dispersent dans l'aliment au hasard. Le fait de mélanger ou agiter le produit conditionné pourrait accélérer la cinétique de décrochement des composés de la surface du matériau plastique. Cependant, les principaux facteurs qui affectent la dispersion sont la solubilité du migrant envers l'aliment et le coefficient de diffusion de chaque molécule.

1.3 LES FACTEURS D'INFLUENCE SUR LA MIGRATION

Il existe des facteurs internes et des facteurs externes qui ont un effet direct sur la diffusivité des molécules présentes dans l'emballage.

Les facteurs internes font référence à des propriétés inhérentes des molécules diffusantes et aux matériaux tels que la nature chimique des substances (monomères, additifs, néoformés) présentes dans les matières plastiques ainsi que l'état structural et la morphologie du polymère.

Le contact avec l'aliment (composition et propriétés chimiques) et les conditions d'exposition ou d'usage du matériau sont des éléments externes influençant la diffusivité.

1.3.1 La nature des constituants du polymère

De façon générale, toutes les substances entrant dans la composition (monomères, catalyseurs, additifs, etc.) des matières plastiques sont susceptibles de migrer. Les additifs (stabilisants et adjuvants technologiques), utilisés pour donner des propriétés spécifiques au produit final, ne sont pas liés à la chaîne polymérique par des liaisons fortes et leur risque de migration est plus élevé.

De plus, des substances ajoutées involontairement dans les matières plastiques, non listées dans le règlement N°10/2011, telles que des impuretés des monomères, des produits de dégradation des additifs et des polluants du PET recyclé, peuvent être aussi présentes dans le polymère. Ces composés sont aussi d'éventuels migrants et beaucoup d'entre eux restent encore à identifier (Skjevrak *et al.*, 2005; Grob *et al.*, 2006).

La nature des migrants potentiels est un des paramètres à prendre en compte pour prédire la diffusion de ces molécules. Feigenbaum *et al.* (1993) ont rapporté que le poids moléculaire et la structure chimique des migrants sont deux paramètres qui ont une influence directe sur le coefficient de diffusion. Naturellement, le coefficient de diffusion diminue si la masse moléculaire augmente.

Trois catégories différentes des migrants représentées dans le tableau 1-1 ont été listées.

Tableau 1-1: Catégories des migrants potentiels emballage/aliment classifiées selon leur poids moléculaire d'après Feigenbaum *et al.* (1993)

Poids moléculaire (PM) du migrant (g/mole)	Type de migrant	Caractéristiques
PM < 250 - 300	Monomères les plus communs. Quelques additifs (p.ex. BHT).	Migration spontanée due à la volatilité des composés.
200 < PM < 1200	Peu de monomères. Additifs communs. Produit de dégradation.	Migration dépendante du type d'aliment conditionné (aqueux/gras).
PM> 1200	Autres additifs. Oligomères. Produits de dégradation des additifs de grande masse.	Migration très basse.

D'un point de vue toxicologique, les molécules avec un poids moléculaire supérieur à 1000 g/mol ne sont pas absorbées par le tractus gastro-intestinal. Par conséquent, elles ne présentent pas un risque pour la santé humaine (Severin *et al.*, 2011).

En ce qui concerne la structure du diffusant, selon les références citées par Pennarun (2001), les molécules linéaires diffusent 1000 fois plus vite que les molécules de forme sphérique avec la même masse moléculaire. Scott (1988) a mis en évidence que l'introduction des groupes *tert*-butylé dans les antioxydants phénoliques diminue la diffusion de ceux-ci.

1.3.2 La nature et l'état du polymère

Le coefficient de diffusion évolue d'une façon plus importante en fonction de la nature et de l'état des polymères. La diffusion dans les polymères à l'état caoutchouteux, comme les polyoléfines et le PVC plastifié, est plus rapide que pour les polymères à l'état vitreux et semi-cristallin (PET, PVC, PA). Par contre, le coefficient de diffusion dans les polymères vitreux est moins dépendant de la structure de la molécule diffusante (Pennarun, 2001; AFSSA, 2006).

1.3.3 La cristallinité du polymère dans l'emballage

Les polymères semi-cristallins sont constitués d'une phase amorphe et d'une phase cristalline. La phase cristalline est composée par un assemblage ordonné des chaînes polymériques liées entre elles. Les chaînes de la phase amorphe sont plus ou moins désordonnées et jouent le rôle de liaison entre les cristallites qui constituent la phase cristalline.

Les phénomènes de diffusion ont été décrits au moyen de deux modèles: un modèle de volume libre et un modèle moléculaire. Dans les deux cas, la diffusion est basée sur l'existence d'une reptation entre les microcavités ou les vides de la phase amorphe des polymères semi-cristallins. Cela provoque le déplacement des molécules piégées dans ces espaces. La cristallinité réduit la mobilité des chaînes en diminuant la distance entre les liaisons des chaînes amorphes et des cristallites. En effet, la cristallinité empêche l'accessibilité aux zones amorphes et allonge le chemin de diffusion. C'est pour cette raison que la phase cristalline agit comme une barrière imperméable à la diffusion (Hedenqvist et Gedde, 1996; Limm et Hollifield, 1996; Sammon *et al.*, 1997).

De plus, des ramifications dans les chaînes du polymère entraînent plus de défauts dans les cristallites d'où un taux de cristallinité plus faible et par conséquent, une augmentation de la diffusivité (Pennarun, 2001).

Dans le chapitre 2, la morphologie et l'état structural des bouteilles en PET destinées au conditionnement des eaux seront traités.

1.3.4 Le milieu au contact

L'interaction entre le matériau polymère et la capacité de dissolution du migrant par l'aliment ont été examinées par Feigenbaum *et al.* (1993). En effet, le caractère lipophile ou hydrophile du migrant va déterminer sa capacité à diffuser vers l'aliment. Les monomères, stabilisants et adjuvants technologiques sont habituellement des molécules lipophiles. Même si leur diffusion est possible dans les aliments aqueux, ils migrent davantage dans les aliments gras.

En termes d'interaction, il existe une possibilité de pénétration du milieu de contact dans l'emballage polymérique en fonction de leurs affinités, par exemple les matières grasses dans les polyoléfines ou bien l'eau dans le PET (AFSSA, 2006). Cette introduction des molécules dans l'ensemble des chaînes macromoléculaires entraîne une baisse de la température de transition vitreuse (*Tg*) du polymère et accélère la diffusion (Zaki, 2008). Une autre conséquence de la pénétration de solvant dans le polymère est le gonflement. Le gonflement endommage la structure interne du polymère ce qui implique que la sorption des autres constituants de l'aliment est facilitée (Konkol, 2004).

1.3.5 La température

Plusieurs auteurs (Limm et Hollifield, 1996; Tehrany et Desobry, 2004) ont décrit l'influence de la température sur le coefficient de diffusion (*D*) représentée par l'équation d'Arrhenius:

$$D = D_0' \cdot \exp\left(\frac{-E_D}{RT}\right) \tag{1-3}$$

Où D_0 est le coefficient de diffusion à une température infinie (J/mol), E_D est l'énergie d'activation de la diffusion, *T* est la température (K) et R est la constante de gaz parfaits. L'énergie d'activation représente l'énergie nécessaire pour avoir un chemin assez grand entre les chaînes polymériques pour qu'une molécule puisse s'y déplacer.

Cependant, la diffusion dans les polymères vitreux au voisinage de leur température de transition vitreuse (*Tg*) ne suit pas l'équation d'Arrhenius mais plutôt une équation de type William, Landel et Ferry (WLF) caractérisée par une énergie d'activation (E_D) que n'est pas constante et varie en fonction de la température (Etienne et David, 2002).

1.4 CADRE REGLEMENTAIRE EUROPEEN SUR LES MATERIAUX A ENTRER EN CONTACT AVEC LES DENREES ALIMENTAIRES

La réglementation actuelle doit garantir une protection de la santé publique et assurer les intérêts du consommateur en ce qui concerne la mise sur le marché des matériaux et objets destinés à entrer en contact avec les aliments (http://europa.eu/legislation/).

Depuis le 17 octobre 2004, l'aptitude des matériaux à entrer en contact avec les aliments est régie par le règlement CE N°1935/2004. L'article 3 de cette réglementation impose un principe d'inertie pour tous les matériaux destinés à entrer en contact avec les aliments. Les matériaux et objets doivent être fabriqués conformément aux bonnes pratiques de fabrication afin que dans les conditions normales ou prévisibles de leur emploi, ils ne puissent pas:

- céder des constituants dans une quantité dangereuse pour la santé humaine,
- entraîner une modification inacceptable de la composition de la denrée,
- entraîner une altération des caractères organoleptiques de la denrée alimentaire.

Complétant ce règlement, il existe des directives spécifiques en fonction du matériau considéré. Ces directives établissent :

- Des listes de substances autorisées «listes positives» pour la fabrication,
- Des critères de pureté,
- Des conditions particulières d'emploi des substances ou du matériau fini,
- Des limites migration spécifiques à certains composés,
- Des limites de migration globale,
- Des spécifications quant aux moyens d'analyse,
- Des dispositions sur la traçabilité,
- Des dispositions particulières sur l'étiquetage.

Le but est d'évaluer la conformité du matériau vis-à-vis du contact avec les denrées alimentaires et c'est à la charge de l'industriel de démontrer la conformité.

Dans les cas des matières plastiques utilisées comme emballage alimentaire, la directive 2002/72/ CE établissait les dispositions qui doivent s'appliquer à ces types des matériaux; complétée par la directive 82/711/CEE sur le contrôles de la migration et par la directive 85/572/CEE sur les simulants.

Depuis le 1 avril de 2011, le règlement (EU) N° 10/2011 publié au Journal Officiel de la Commission Européenne le 14 janvier a abrogé ces directives. Cette nouvelle législation est entrée en vigueur le 1 mai 2011 et implique un élargissement au niveau du champ d'application et de la liste de constituants autorisés, ainsi qu'une modification des dispositions générales pour les contrôles de conformité (essais de migration et liste de simulants) (http://www.contactalimentaire.com). Sa mise en place comporte une période d'adaptation aux nouvelles dispositions, qui prendra fin le 31 décembre 2015. Les essais de migration sont réalisés selon la directive 82/711/CE jusqu'au 31 décembre 2012.

Ci-après, seront décrites les principales dispositions de la directive 2002/72/CE ayant servi d'appui pour la partie expérimentale de ce travail de recherche. Ensuite, les principales modifications du nouveau règlement N°10/2011 seront exposées.

1.4.1 Directive 2002/72/CE

Cette législation contient la liste de substances autorisées (liste positive) pouvant entrer dans la composition des matières plastiques avec leurs restrictions et/ou spécifications (LMS, QM, QMA et R) évaluées au regard de leur migration ou leurs potentiel toxique. Les substances qui ne sont pas sur cette liste sont soit interdites, soit n'ont pas été évaluées du fait du manque de données toxicologiques. La nature des tests toxicologiques dépend du niveau de migration, par exemple pour les migrations inférieures à 0,05 mg/kg d'aliment seuls des tests de génotoxiques sont demandés (cf. tableau 1-2).

Tableau 1-2: Informations toxicologiques demandées par l'EFSA pour l'évaluation des substances utilisées dans les matériaux à contact alimentaire (EFSA, 2005)

Migration < 0.05 mg/kg (minimum dossier)	3 Mutagenicity studies in vitro (test for gene mutations in bacteria; test for induction of gene mutation in mammalian cells; test for induction of chromosomal aberrations in mammalian cells).
0.05 < migration < 5mg/kg (intermediate dossier)	3 Mutagenicity studies in vitro (as above).
	90-day oral toxicity studies (in 2 species).
	Data to demonstrate the absence of potential for accumulation in man.
5 < migration < 60 mg/kg (full dossier)	3 Mutagenicity studies in vitro (as above).
	90-day oral toxicity studies (in 2 species).
	Studies on absorption, distribution, metabolism and excretion.
	Studies on reproduction (1 species) and developmental toxicity (2 species).
	Studies in long-term toxicity carcinogenicity (2 species).

Il est possible d'inclure de nouveaux constituants dans les listes positives. Pour obtenir cette autorisation, il est nécessaire de fournir les principales dispositions fixées par les instances scientifiques agréées : les données physico-chimiques ainsi que des données toxicologiques dans l'usage prévu permettant d'évaluer les risques pour la santé humaine.

Dans cette directive, la notion de migration globale et les dispositions pour sa mesure sont décrites:

- **Les limites de migration globale (LMG)**

La migration globale est le premier critère pour évaluer l'inertie de l'emballage alimentaire. Elle est définie comme la masse totale cédée par l'emballage à l'aliment à son contact, appelé *migrat*. La LMG est fixée à 60 mg/kg d'aliment ou 10 mg/dm^2 de matériau pour des contenants de taille moyenne et elle est indépendante de la toxicité des migrants.

- **Les limites de migration spécifique (LMS)**

La migration spécifique est la masse totale d'un constituant connu et bien identifié qui migre de l'emballage vers l'aliment, on parle de *migrant*. La LMS est basée sur des critères toxicologiques et peut s'exprimer en mg de migrant / kg d'aliment ou bien en mg de migrant / dm^2 de matériau. Cette limite est liée à la dose journalière tolérable (DJT) calculée selon la relation:

LMS (mg/kg aliment) = 60 x DJT (mg/kg poids corporel/jour) ou LMS (mg/kg) = 6 × LMS (mg/dm^2) ou LMS (mg/dm^2) = 10 DJT.

- **La concentration maximale dans le matériau d'emballage (QM)**

C'est la quantité maximale autorisée de substance (dose maximale d'emploi) dans le matériau pour lequel on ne tolère aucune migration détectable dans l'aliment. Cette restriction est employée pour des substances avec des doses tolérables très basses. C'est le résultat d'une combinaison entre des impératifs sanitaires, des critères toxicologiques et des limites analytiques.

- **La concentration maximale par unité d'emballage (QMA)**

Cette restriction est la quantité maximale par unité d'aire d'emballage, employée lorsque la migration est inférieure à 0,05 mg/kg. C'est le cas des substances employées en très faibles quantités, dont la migration est faible et lorsque la migration totale reste acceptable.

- **La restriction R**

C'est une restriction de la migration, pour les substances dont la migration est très faible et dont le dossier est acceptable sur la base d'un dossier toxicologique restreint, sans connaissance de la dose journalière tolérable (DJT).

Comme précédemment indiqué, la directive 2002/72/CE était associée à des textes de référence qui spécifient les dispositions pour la réalisation les essais de migration dans des simulants alimentaires. Ces textes de référence sont les suivants:

- ***Directive 82/711/CE (modifiée par les directives 93/8/CEE puis 97/48/CE)*:** établit les conditions dans lesquelles les tests de migration doivent être réalisés (temps de contact et température). Dans les cas de l'eau embouteillée en PET, pour laquelle le temps de contact réel est supérieure à 24h, le test de migration doit être réalisé pendant 10 jours à 40°C.

- ***Directive 97/48/CE qui modifié la directive 82/711/CE*:** précise que les essais de migration doivent toujours être réalisés selon les conditions de contact correspondantes au pire cas prévu pour les matériaux soumis à étude. Cette directive définit comment réaliser des essais de substitution et alternatifs, quand l'essai de migration n'est pas réalisable pour des raisons techniques liées à la méthode d'analyse.

- ***Directive 85/572/CEE:*** précise la liste des simulants et indique comment faire le choix des simulants appropriés pour réaliser les essais de migration, en tenant en compte de la composition chimique des denrées alimentaires et aussi de leur état physique. Dans le cas de l'eau embouteillée qui a habituellement un pH supérieur à 4,5, le simulant A (l'eau distillée ou l'eau de qualité équivalente) doit être utilisé pour la réalisation des tests de migration.

1.4.2 Règlement No. 10/2011

Dans ce nouveau texte, le champ d'application de la législation a été élargi aux couches en matières plastiques des matériaux et objets multicouches. Cette nouvelle réglementation concrétise le statut de certaines substances et/ou constituants des matières plastiques:

- Il est précisé que les auxiliaires de polymérisation tels que les catalyseurs, les réactifs de transfert, allongement et arrêt de chaînes du polymère qui ne sont pas destinés à rester dans le polymère final ne sont pas soumis à la procédure d'autorisation de l'Union Européenne.
- Il est spécifié que les matériaux et objets en matières plastiques peuvent contenir des substances ajoutées involontairement (SAI ou NIAS en anglais pour *«Non-Intentionally Added Substances»*). Il peut s'agir d'impuretés présentes dans les produits de départ, des produits de réaction ou de dégradation formés lors de la fabrication des matériaux ou objets en matières plastique. Cependant, le règlement établit l'impossibilité de prendre en compte et de lister toutes ces molécules. Par conséquent, des impuretés peuvent être présentes sans être inscrites sur la liste de l'Union Européenne.
- Pour les matériaux multicouches en matière plastique contenant une barrière fonctionnelle, il est établi que des substances non autorisées peuvent être utilisées derrière cette barrière fonctionnelle. Cependant, une limite maximale de migration de 10 µg/kg a été fixée pour la migration d'une substance non autorisée vers l'aliment à travers cette barrière. Il a été interdit d'utiliser des substances mutagènes, cancérogènes ou toxiques pour la reproduction.
- L'utilisation de nanoparticules pour la fabrication des matières plastiques et les risques toxicologiques associés doivent être évalués au cas par cas. Ces nanoparticules artificielles ne sont pas englobées dans ce règlement.

En ce qui concerne, la liste de substances approuvées et les conditions d'essai de migration pour la conformité des matériaux plastiques:

- La liste des substances autorisées est complète et constituée pour une liste exhaustive de monomères et additifs.
- La limite de migration globale (LMG) pour les matières plastiques en contact avec des aliments destinés aux nourrissons et enfants en bas âge ne doit pas dépasser 60 mg des constituants totaux par kg de simulant de denrée alimentaire.
- Il a été établi une limite de migration spécifique (LMS) générique de 60 mg/kg pour les substances de la liste positive pour lesquelles aucune LMS ou restriction a été fixée.
- Les dispositions de base nécessaires à la réalisation des essais de migration des constituants des matériaux ont été modifiées (simulants, conditions des essais, etc.).

1.5 LES MIGRANTS POTENTIELS DES BOUTEILLES EN PET

La composition chimique des bouteilles en PET comporte de nombreux composés organiques et inorganiques susceptibles de diffuser vers l'eau. Les candidats potentiels à la migration sont les suivants:

- Les monomères et comonomères utilisés pour la polymérisation ainsi que les produits secondaires générés durant la synthèse du polymère ou la mise en œuvre suite à des réactions de dégradation (Begley et Hollifield, 1989).
- Les additifs utilisés pour donner certaines propriétés au polymère tels que des plastifiants, des antioxydants, des stabilisants, etc. (Pennarun, 2001).
- Les substances, ne faisant pas partie des listes positives, qui sont introduites involontairement durant la fabrication des matières plastqiues (NIAS) (Franz et Welle, 2008). Il peut s'agir:

  - Des impuretés présentes dans les additifs utilisés pour la mise en œuvre de l'emballage (Muncke, 2009).

  - Des néoformés issus de la dégradation de ces additifs sous l'action de la lumière, la température, par oxydation, par hydrolyse ou bien suite à des réactions chimiques entre eux. Actuellement, il y a encore une méconnaissance des mécanismes de ces dégradations (Severin *et al.*, 2011).

  - Des substances étrangères en provenance de l'extérieur et en lien avec un manque d'impermeabilité de l'emballage (Konkol, 2004).

  - Des pollutions avant le recyclage de l'emballage suite à un usage non adéquat de celui-ci (produits domestiques, essence, huiles, diluants, solvants, pesticides et autres) (Sax, 2010).

Dans les prochaines sections, les ingrédients entrant dans la formulation des bouteilles en PET ainsi que les produits connus de dégradation vont être passés en revue, afin de déterminer une liste des composés susceptibles de se trouver dans l'eau embouteillée.

1.5.1 Les monomères et catalyseurs

Les monomères, comonomères et catalyseurs utilisés dans la synthèse du PET peuvent ne pas réagir dans leur totalité et rester dans la matrice PET. Dans le chapitre 2, les ingrédients de départ pour la synthèse du PET seront explicités.

L'acide téréphtalique, le téréphtalate de diméthyle et l'éthylène glycol sont les composés les plus communs utilisés pour la synthèse du PET. Le produit intermédiaire formé dans les deux principaux mécanismes de synthèse est le bis-2-(hydroxyéthyle)téréphtalate (BHET). Les catalyseurs à base d'antimoine (Sb) sont les plus communément employés pour accélérer la réaction de polycondensation du PET. La présence de traces d'antimoine dans les bouteilles en PET est bien connue et a été largement étudiée (Nishioka *et al.*, 2002; Westerhoff *et al.*, 2008; Keresztes *et al.*, 2009).

Les concentrations de monomères et des catalyseurs détectés dans l'emballage PET et dans l'eau embouteillée sont exposées dans la section 1.6.

1.5.2 Les produits de dégradation du PET

Les néoformés sont générés suite à des réactions secondaires pendant la polymérisation du PET. La principale production a lieu pendant la polycondensation du PET en raison des températures élevées de travail (~ 280 – 300°C). Mais l'hydrolyse et l'oxydation du polymère peuvent aussi générer des néoformés. Besnoin et Choi (1989) et Naït-Ali (2008) ont listé les composés qui peuvent être générés. Ces produits de dégradation peuvent modifier les propriétés de l'emballage PET et certains sont susceptibles d'être des migrants potentiels.

Ci-dessous, sont présentés exclusivement les mécanismes de formation des produits de dégradation du PET qui peuvent présenter un risque potentiel de diffusion vers l'eau. Les concentrations de ces produits dans le PET et l'eau sont présentées dans la section 1.6.

- **Formation de diéthylène glycol (DEG).**

La formation de DEG dans le PET peut s'expliquer par une réaction de déshydratation des chaînes du BHET, ce qui implique la formation des groupements éthers en terminaison (cf. figure 1-2). Ces groupements éthers ont une influence directe sur le degré de flexibilité des chaînes du PET et ralentissent la cristallisation du polymère. C'est pour cette raison que le DEG s'utilise aussi comme comonomère dans certains qualités de PET (Romão *et al.*, 2009b).

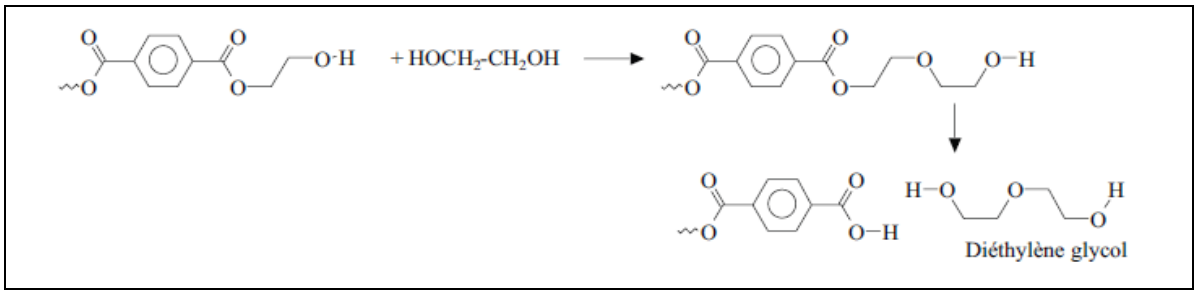


Figure 1-2: Réaction de formation du diéthylène glycol à partir du PET (AFSSA, 2006)

En tout cas, la formation de ce composé dépend de la température, du temps de réaction et du type de catalyseur. En effet, Chen et Chen (1999) ont mis en évidence que l'utilisation du trioxyde d'antimoine comme catalyseur durant la polycondensation du PET augmente la formation de DEG résiduel.

- **Formation d'acétaldéhyde et formaldéhyde**

La présence et la diffusion de l'acétaldéhyde de l'emballage PET vers l'eau ont été largement étudiées (Pepin *et al.*, 1983; Lorusso *et al.*, 1985; Nawrocki *et al.*, 2002; Ewender *et al.*, 2003; Mutsuga *et al.*, 2006). Ce composé volatil est généré par dégradation thermique du PET. La formation de groupements vinyle entraîne la libération d'acétaldéhyde par réaction avec l'eau ou avec les fins de chaînes hydroxyles (cf. figure 1-3). De plus, l'acétaldéhyde est source d'altérations organoleptiques dans l'eau embouteillée en PET (Nijssen *et al.*, 1996).

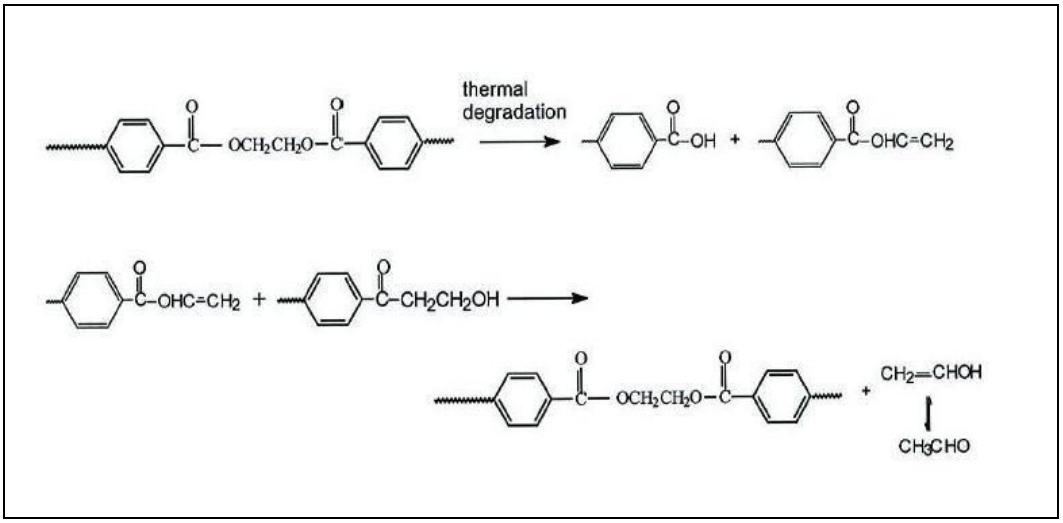


Figure 1-3: Réaction de formation de l'acétaldéhyde (Konkol, 2004)

Le formaldéhyde est un autre composé volatil résultant de la décomposition thermique et aussi de la dégradation thermo-oxydative du PET (Kovarskaya *et al.*, 1968; Villain *et al.*, 1994). Les études de migration du formaldéhyde et l'acétaldéhyde des bouteilles en PET vers l'eau référencées dans la bibliographie seront détaillées ultérieurement dans la section 1.6.

- **Formation des oligomères cycliques**

Les oligomères sont produits par une réaction de cyclopolymérisation entre les ponts esters et les groupements hydroxyles au cours de la polycondensation du PET. Les principaux mécanismes réactionnels qui génèrent ce type de composés sont illustrés dans la figure 1-4.

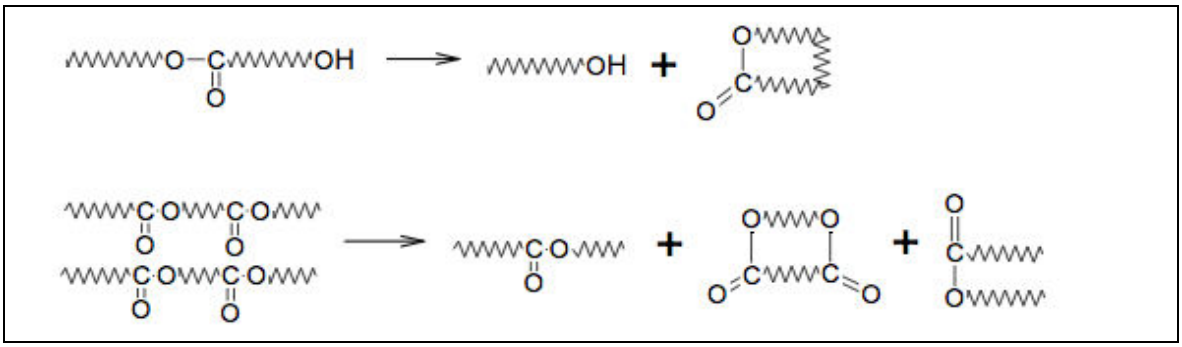


Figure 1-4: Réactions de cyclopolymérisation conduisant à la formation des oligomères (Naït-Ali, 2008)

La formation de ces oligomères a une influence directe sur la cristallisation du polymère. C'est pour cette raison qu'il est important de minimiser ces réactions, notamment avec du chlorure du benzoyle. La présence de ces oligomères dans le PET comme possibles molécules diffusantes a été étudiée par plusieurs auteurs (Ashby, 1988; Begley et Hollifield, 1989; Castle *et al.*, 1989; Harrison *et al.*, 1997; Mutsuga *et al.*, 2005).

1.5.3 Les additifs

Les additifs sont ajoutés aux matières plastiques afin de faciliter leur mise en œuvre, de modifier, d'améliorer ou d'adapter leurs propriétés mécaniques, chimiques et biologiques dont d'augmenter leur durée de vie (Zweifel, 2001; Zaki, 2008). Il existe un grand nombre d'additifs avec une multitude de rôles. Comme indiqué précédemment, les additifs sont la source la plus importante de migrants potentiels en générant des néoformés parce qu'ils ne sont pas liés chimiquement à la chaîne polymérique (Severin *et al.*, 2011).

Deux catégories principales d'additifs ont été détaillées par Pennarun (2001) et Zweifel (2001):

a) Les stabilisants:

Leur fonction est d'empêcher ou de retarder les dégradations par oxydation de la structure chimique du polymère. Cette oxydation peut se produire pendant la mise en œuvre ou l'usage du matériau plastique. Les stabilisants permettent d'inhiber, réduire ou/et modifier la formation de ces radicaux afin d'augmenter la durée de vie du polymère (Lau et Wong, 2000; Zaki, 2008).

Il existe deux principaux types de stabilisants:

- ***Les antioxydants***

Les antioxydants sont ajoutés pour freiner les réactions d'oxydation lors de l'extrusion, la mise en forme et de l'utilisation de la matière plastique. Ils sont normalement ajoutés jusqu'à une quantité de 2% en masse avant la mise en œuvre du polymère.

Il existe différents types d'antioxydants destinés aux matières plastiques selon le mécanisme utilisé pour inhiber l'oxydation: des donneurs d'hydrogène, des piégeurs de radicaux libres et des composés facilitant la décomposition de groupements hydroperoxydés. Les antioxydants phénoliques appartiennent au groupe des donneurs d'hydrogène et ils sont les plus utilisés pour la stabilisation des polymères (Zweifel, 2001; Strandberg et Albertsson, 2008).

- ***Les stabilisants UV***

La cause principale de la dégradation par photo-oxydation des matériaux plastiques est la présence d'impuretés ou de groupements chromophores dans le polymère. Le mécanisme de protection des stabilisants UV est basé sur l'absorption de la radiation UV dangereuse et ensuite sa dissipation par exemple sous forme de chaleur. Les stabilisants UV les plus communs sont les 2-hydroxybenzophénones, les 2-hydroxyphenylbenzotriazoles et des composés organiques à base de nickel et des amines (Zweifel, 2001).

b) Les adjuvants technologiques

Ces composés sont ajoutés aux polymères pour améliorer ou modifier leurs propriétés comme la stabilité, la souplesse, la teinte, etc.

Les adjuvants peuvent être classés selon leur fonction (Pennarun, 2001):

- Les modificateurs de propriétés mécaniques (charges, renforts, antichocs, etc.).
- Les modificateurs des propriétés de surface (antistatiques, lubrifiants, etc.).
- Les additifs de mise en œuvre (plastifiants, agents de nucléation, agents de réticulation, etc.).
- Les colorants et pigments.

Comme indiqué, les bonnes propriétés intrinsèques du PET font que ce polymère atteint les propriétés souhaitées sans le recours à des additifs tels que des antioxydants et plastifiants (ILSI, 2000).

Ci-dessous, sont présentés les additifs et leurs produits de dégradation référencés dans la bibliographie qui sont utilisés dans les bouteilles en PET destinées au conditionnement de l'eau:

- ***Colorants:*** les pigments sont ajoutés au niveau de traces (quantité inférieure à 0,0005%) pour quelques qualités de PET. Le phtalocyanine de cuivre est un pigment utilisé pour donner une coloration bleue aux matières plastiques. Ce composé se caractérise pour une grande stabilité thermique. Normalement aux températures d'usage du matériau polymérique aucun produit de dégradation de ce composé n'a pas été rapporté (FSA, 2007).
- ***Stabilisants UV*:** Selon la liste positive du règlement N°10/2011, des nanoparticules à base de titane sont employés comme stabilisants UV des bouteilles en PET destinées au conditionnement de l'eau. Les nanoparticules de nitrure de titane ont pour fonction de réduire le jaunissement du PET du à l'exposition solaire et d'augmenter la résistance du polymère pendant sa mis en œuvre (http://www.nabond.com/TiN_nanopowder.html).
- ***Agents complexants (« scavengers ») et agents stabilisants de l'acétaldéhyde***: Ce composé est la cause principale des modifications organoleptiques de l'eau embouteillée. Il existe des additifs qui, lorsqu'ils sont ajoutés durant le processus de production des bouteilles, sont capables d'inhiber la production d'acétaldéhyde. Il s'agit d'agents complexants ou d'agents stabilisants, en fonction de leur mécanisme d'action.

Villain *et al.* (1995) ont testé plusieurs agents stabilisants pour inhiber ou réduire la dégradation thermique du PET et par voie de conséquence la production d'acétaldéhyde et de formaldéhyde. L'acide 4-amine benzoïque, la diphényl amine, l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque ont montré la meilleure capacité de stabilisation des résines en PET. Jen (2002) ont breveté une méthode pour la production des granulés en PET avec une basse concentration en acétaldéhyde. La méthode est basée sur l'utilisation de stabilisants phosphoriques combinée à un antioxydant phénolique (Irganox-425), ajoutés avant la polycondensation du PET. Rule *et al.* (2001) ont rapporté l'anthranilamide comme l'agent complexant de l'acétaldéhyde le plus utilisé pour la fabrication des bouteilles en PET destinées à le conditionnement de l'eau.

Pour résumer cette section sur les additifs et adjuvants technologiques, on peut affirmer que les seuls additifs employés pour les bouteilles PET destinées exclusivement au conditionnement de l'eau sont des colorants, des nanoparticules à base de titane (stabilisants UV) et des agents complexants ou stabilisants de l'acétaldéhyde.

Cependant, des nombreuses publications ont montré la présence de certaines substances dans les eaux embouteillée en PET *a priori* non attendues, comme c'est le cas des phtalates, et qui ne correspondent pas à une pollution des ressources en eau. La source de ces molécules est controversée. De plus, plusieurs auteurs ont mis en évidence les risques sanitaires résultant du mélange de ces molécules dans les eaux au moyen d'essais de cytotoxicité, de genotoxicité et de perturbation endocrinienne.

La prochaine section est constituée par une revue bibliographique publiée dans «*Water Research*».

«Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: a source of controversy reviewed»

Cette publication est dédiée à la compilation de toutes les substances détectées et identifiées exclusivement dans les eaux embouteillées en PET. Les conditions de migration expérimentales, les approches toxicologiques et l'origine de ces molécules sont rassemblées et discutées, afin de déterminer si le matériau PET peut constituer une source de composés indésirables dans l'eau embouteillée.

Author's personal copy

WATER RESEARCH 46 (2012) 571–583

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed

Cristina Bach [a,b,*], Xavier Dauchy [a], Marie-Christine Chagnon [c], Serge Etienne [b]

[a] ANSES, Nancy Laboratory for Hydrology, Water Chemistry Department, 40 rue Lionnois, 54000 Nancy, France
[b] Institute Jean Lamour, UMR 7198, Department SI2M, Ecole des Mines de Nancy, Nancy-University, Parc de Saurupt, CS 14234, 54042 Nancy, France
[c] Derttech "Packtox", University of Burgundy, 1 Esplanade Erasme, AgroSupDijon Nord, 21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 July 2011
Received in revised form
21 November 2011
Accepted 22 November 2011
Available online 6 December 2011

Keywords:
Bottled water
Mutagenicity
Genotoxicity
Endocrine disruptors
NIAS

ABSTRACT

A declaration of conformity according to European regulation No. 10/2011 is required to ensure the safety of plastic materials in contact with foodstuffs. This regulation established a positive list of substances that are authorized for use in plastic materials. Some compounds are subject to restrictions and/or specifications according to their toxicological data. Despite this, the analysis of PET reveals some non-intentionally added substances (NIAS) produced by authorized initial reactants and additives.

Genotoxic and estrogenic activities in PET-bottled water have been reported. Chemical mixtures in bottled water have been suggested as the source of these toxicological effects. Furthermore, sample preparation techniques, such as solid-phase extraction (SPE), to extract estrogen-like compounds in bottled water are controversial. It has been suggested that inappropriate extraction methods and sample treatment may result in false-negative or positive responses when testing water extracts in bioassays. There is therefore a need to combine chemical analysis with bioassays to carry out hazard assessments.

Formaldehyde, acetaldehyde and antimony are clearly related to migration from PET into water. However, several studies have shown other theoretically unexpected substances in bottled water. The origin of these compounds has not been clearly established (PET container, cap-sealing resins, background contamination, water processing steps, NIAS, recycled PET, etc.).

Here, we surveyed toxicological studies on PET-bottled water and chemical compounds that may be present therein. Our literature review shows that contradictory results for PET-

List of abbreviations: AA, acetaldehyde; APEOs, polyethoxylated nonylphenols; BBP, benzylbutyl phthalate; BHET, bis(hydroxyethyl) terephthalate; BHT, butylated hydroxytoluene; BPA, bisphenol A; DBP, dibutyl phthalate; DiBP, di-iso-butyl phthalate; DEG, diethylene glycol; DEHP, di-2-(ethylhexyl) phthalate; DEHA, bis-2-ethylhexyl adipate; DEP, diethyl phthalate; DMSO, dimethyl sulfoxide; DMT, dimethylterephthalate; DOP, di-n-octyl phthalate; EEC, European economic community; EEQs, estradiol equivalents; GC–MS, gas chromatography–mass spectrometry; HDPE, high density polyethylene; HULYs, human blood lymphocytes; IPA, isophthalic acid; LDH, lactate dehydrogenase; MEG, ethylene glycol; NIAS, non-intentionally added substances; NP, 4-nonylphenol; OP, octylphenol; PA, polyamide; PC, polycarbonate; PhA, phthalic acid; PVC, polyvinylchloride; RPE, relative proliferative effects; Sb_2O_3, antimony trioxide; SEC–HPLC, size exclusion chromatography–high performance liquid chromatography; SML, specific migration limits; SPE, solid-phase extraction; SPME, solid-phase micro-extraction; SODIS, solar water disinfection; TPA, terephthalic acid; TDI, tolerable daily intake; TNPP, tris(nonylphenyl) phosphite; TOC, total organic carbon; YES, yeast estrogen screen.

* *Corresponding author.* ANSES, Nancy Laboratory for Hydrology, Water Chemistry Department, 40 rue Lionnois, 54000 Nancy, France. Tel.: +33 383 38 87 29; fax: +33 383 38 87 20.
E-mail address: cristina.bach@anses.fr (C. Bach).
0043-1354/$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.watres.2011.11.062

Author's personal copy

bottled water have been reported, and differences can be explained by the wide variety of analytical methods, bioassays and exposure conditions employed.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction ... 572
1.1. The synthesis of PET ... 572
1.2. The manufacture of PET bottles for drinking water ... 572
1.3. European regulations for plastic food-contact materials ... 573
2. Substances investigated in PET and PET-bottled water ... 573
2.1. PET monomers and oligomers ... 573
2.2. Traces of metals ... 573
2.3. Carbonyl compounds ... 574
2.3.1. Carbonyl compounds in PET raw material, preforms and bottles ... 574
2.3.2. Studies of migration of carbonyl compounds into PET-bottled water ... 575
2.4. Plasticizers ... 575
2.5. Antioxidants ... 577
2.5.1. Alkylphenols ... 577
2.5.2. Butylated hydroxytoluene (BHT) ... 578
2.6. UV stabilizers ... 578
2.7. Lubricants ... 578
2.8. Bisphenol A ... 578
3. Toxicological evaluation of PET-bottled water ... 578
3.1. Genotoxicity assays ... 578
3.2. Endocrine disruptor assays ... 579
4. Discussion and conclusions ... 580
. References ... 580

1. Introduction

Polyethylene terephthalate (PET) is a semi-crystalline polymer belonging to the family of polyesters. It is the most favorable packaging material for drinking water. PET bottles have been marketed for the last four decades and they have gradually replaced polyvinylchloride (PVC) and glass bottles on the markets. In Europe, packaged water sales account for 44% of the market volume for non-alcoholic drinks in 2009, with an average individual consumption of 105 L per year (EFBW, 2011).

1.1. *The synthesis of PET*

The prepolymerization of dimethylterephthalate (DMT) or terephthalic acid (TPA) with ethylene glycol (MEG) is the first industrial step in the synthesis of PET. Both reactions generate low-weight oligomers and an intermediate compound named bis(hydroxyethyl)terephthalate (BHET). After this step, a second polycondensation is carried out with an Sb-, Ge- or Ti-based catalyst (ILSI, 2000; Fakirov, 2002).

During PET manufacturing, several degradation and decomposition reactions can occur. High temperatures and the presence of oxygen in the PET melt process can promote thermo-mechanical and thermo-oxidative reactions (Romão et al., 2009a). Also, PET hydrolysis can be induced by the presence of water during the melt process (Zhang and Ward, 1995; Paci and La Mantia, 1998).

PET thermal degradation generates sub-products such as oligomers and diethylene glycol. Volatile organic compounds such as carbon monoxide, aldehydes (formaldehyde, acetaldehyde, benzaldehyde), C_1–C_4 aliphatic hydrocarbons, aromatic hydrocarbons (benzene, toluene, ethylbenzene and styrene), esters (vinyl benzene, methyl acetate), methanol, and acetophenone were identified in PET samples subjected to temperatures between 200 and 300 °C (Dzięcioł and Trzeszczyński, 2000). In addition, 1,3-dioxolane and 2-methyl-1,3-dioxolane as thermal degradation products in PET bottles (Franz and Welle, 2008).

PET thermal stability depends on the type of co-monomers used for its production (Holland and Hay, 2002b). Concerning bottle-grade PET, co-polymerization with diethylene glycol (DEG) and isophthalic acid (IPA) is usually carried out to minimize polymer thermal crystallization during the production of preforms and the blow-molding process. Both co-monomers reduce the size of spherulites and, as a result the final container is transparent (Holland and Hay, 2002a). Indeed, glass-like transparency is a valued commodity for drinking-water bottles.

1.2. *The manufacture of PET bottles for drinking water*

Injection blow-molding is the preferred process for manufacturing PET bottles. Amorphous preforms are

Author's personal copy

obtained by processing PET granules. Preforms are stretched by a blow-molding process to achieve bi-axially oriented bottles. The barrier properties and the diffusion rate are directly affected by the degree of crystallinity and the orientation of polymer chains in PET bottles. The selection of an adequate blow temperature around 20 °C above the PET glass transition temperature (T_g) is essential to achieve these properties (Tadmor and Gogos, 2006).

Despite the good barrier properties of PET, packaging applications require even lower gas permeability. One recent development is the blending of immiscible lamellar polyamide (PA) phases within the PET. This reduces the permeability of O_2 and CO_2 by a factor of two or more. A hexanedioic acid polymer with 1,3-benzenedimethanamine (called MXD6) is used as barrier material in PET bottles (FSA, 2007). However, this PA layer can generate NIAS (Franz and Welle, 2008).

Additives such as plasticizers and antioxidants are not necessary for PET bottles, and colorants are added in small quantities. Acetaldehyde (AA) scavengers are used in PET bottles intended for mineral water to minimize AA content of the melt-processed polyester. The current use of AA scavengers is described in US patent 6274212 (Rule et al., 2001). Anthranilamide is particularly preferred because of its low cost, efficiency and ease of incorporation into PET.

Nowadays, the recycling of PET bottles is a common environmentally friendly procedure, and is used to reduce plastic waste and to reprocess plastics for other applications. In Europe, Regulation No. 282/2008 sets the guidelines for the recycling of plastics for food-contact applications. A variety of recycling technologies have been developed for plastic packaging (EFSA, 2011). PET bottle to bottle recycling processes have been established worldwide due to their huge potential. A rigorous review of this technology has recently been published by Welle (2011).

1.3. *European regulations for plastic food-contact materials*

European Regulation No.1935/2004 (EU, 2004) covers 17 groups of different materials. It states that food-contact materials should not transfer its constituents to food in quantities that could incur a human health risk, cause an unacceptable change in the composition of the food or bring about deterioration in the food organoleptic characteristics. This regulation is accompanied by specific measures depending on the type of material.

Food-contact plastic materials are covered by the recent Regulation No. 10/2011 (EU, 2011). This regulation establishes the list of compounds authorized for use in plastic formulation on a positive list. The conformity of a plastic material intended to come in contact with food is based on migration tests. The overall migration limit should not exceed 10 mg of the total constituents released for dm^2 of packaging surface. Specific migration limits (SML) established according to toxicological data is provided for some substances. The main limitation of this regulation concerns impurities and breakdown products generated by authorized initial reactants and additives (NIAS). Furthermore, the new regulation specifies that: "the notion of the risk due to the substance concerns the substance itself, the impurities of this substance and any reaction or degradation products".

Numerous studies have investigated the interaction of PET bottles in contact with drinking water to provide analytical and toxicological data. Chemical mixtures with estrogenic activity have been reported for PET-bottled water. The presence of NIAS has been designated as a source of this toxicological effect (Evandri et al., 2000; Leivadara et al., 2008). Further, it has been suggested that stresses applied to a material during its production can change its chemical structure and generate degradation products, which in turn may have estrogenicity (Yang et al., 2011). In some cases, the origin of substances found in bottled drinking water has not been clearly established and remains to be elucidated.

Here, our main purpose was to provide a compilation of all known and still controversial data which have been reported regarding PET-bottled drinking water. The chemical compounds, the experimental conditions, the toxicological approaches, and the source of water pollution will be discussed to clarify the relevance of PET packaging as a source of genotoxic and estrogen-like compounds.

2. Substances investigated in PET and PET-bottled water

2.1. *PET monomers and oligomers*

Regulation No. 10/2011 specifies SMLs for MEG, IPA and TPA of 30 mg/kg, 5 mg/kg, and 7.5 mg/kg, respectively. A review of the literature did not turn up any recent studies of diffusion of these compounds into PET-bottled water. Although, many migration tests of these compounds from PET into distilled water are conducted every year worldwide as part of necessary compliance, the migration of monomers (TPA, IPA, MEG) from PET into distilled water is so low that the results are never published because the lack of practical interest. Only Mutsuga et al. (2005) have reported levels of oligomers ranging from 4.9 to 8.7 μg/kg in PET bottle-grade, but no recent migration studies of oligomers from PET into water have been published.

2.2. *Traces of metals*

Inorganic species may be present as residues from the catalysts or additives used to produce PET. Antimony trioxide (Sb_2O_3) is the most important catalyst used in the synthesis of this polyester (EU, 2008). PET typically contains Sb levels in the range of 170–300 mg/kg (Nishioka et al., 2002; Westerhoff et al., 2008; Keresztes et al., 2009). However, only a small fraction of the Sb contained in PET is released into the water (Welle and Franz, 2011). Other metals such as Co, Cr, Fe and Mn, with 27 mg/kg, 0.1 mg/kg, 1.3 mg/kg and 0.3 mg/kg, respectively have been found in PET bottles (Westerhoff et al., 2008). Their relatively low levels observed in polymeric material, compared to Sb, explain why so few studies have been done on migration of these metals into bottled water.

All the reviewed studies agree that Sb is the most relevant element leached from PET bottles. The SML prescribed for Sb is 0.04 mg/kg (EU, 2011). Recently, Welle and Franz (2011) reported that the worst case of exposure to Sb due to diffusion never reached the SML stipulated in European packaging regulations. The data from all reviewed studies on Sb migration

Author's personal copy

into PET-bottled water, collected in Table 1, never exceeded this SML.

The Sb leaching from PET into water increases rapidly during the first storage period and then the migration reaches a "steady state" (Keresztes et al., 2009). Our literature review shows that Sb diffusion is a thermally activated process. Sb concentrations were found to have increased by 90% on average in 48 brands of bottled drinking water after a period of 6 months at room temperature (Shotyk and Krachler, 2007). Also, a significant effect of temperature on the release of Sb has been shown (Westerhoff et al., 2008; Keresztes et al., 2009; Cheng et al., 2010; Bach et al., 2011).

Keresztes et al. (2009) demonstrated that the Sb dissolution rate into water is higher into sparkling water than into still water, due to the lower pH of carbonated water. The higher release of Sb due to low pH has also been observed (Cheng et al., 2010). In contrast, PET exposure to sunlight appears to be less significant than other factors in Sb migration (Keresztes et al., 2009; Cheng et al., 2010).

Contradictory conclusions have been reached regarding the effect of bottle color on Sb migration. Whereas Westerhoff et al. (2008) detected an increase in Sb concentration in clear PET compared to colored ones, Reimann et al. (2010) concluded the opposite.

The contact surface area has also an effect on Sb release from PET to water. With identical contact conditions, it has been shown that higher bottle volumes release lower levels of Sb (Keresztes et al., 2009; Welle and Franz, 2011).

No significant traces of inorganic elements other than Sb in PET-bottled water subjected to different conditions (low pH, outdoor sunlight irradiation, in-car storage, cooling, heating and microwave treatment) have been observed (Cheng et al., 2010; Reimann et al., 2010). More metals can leach from glass (Ce, Pb, Al, and Zr) than from PET bottles into water (Reimann et al., 2010).

2.3. *Carbonyl compounds*

Formaldehyde and acetaldehyde are the most relevant carbonyl compounds migrating from PET bottles. They are generated by thermo-mechanical and thermo-oxidative degradation of PET (Kovarskaya et al., 1968; Romão et al., 2009b). The migration of acetaldehyde into bottled water has been widely investigated. However, only a few studies have been devoted to study presence of other carbonyl compounds (formaldehyde, propanal, butanal, etc.) in PET-bottled water.

2.3.1. *Carbonyl compounds in PET raw material, preforms and bottles*

Formaldehyde and acetaldehyde amounts in the PET wall depend on the chemical quality of the raw material, the molecular weight of the polymer and on the manufacturing

Table 1 – Results of antimony (Sb) migration from PET into bottled water.

Exposure temperature (°C)	Exposure conditions	Simulant	Other parameters	Concentration mean (μg/L)	Concentration range (μg/L)	References
Refrigerated	24 h, darkness	Ultrapure water	–	–	0.846 ± 1.652	Cheng et al. (2010)
Refrigerated	37 days	Groundwater	–	–	0.05 ± 0.017	Shotyk et al. (2006)
Refrigerated (2 °C)	150 days	Ultrapure water at pH = 6.5	Water bottled in hard PET	0.003	–	Reimann et al. (2010)
Refrigerated (2 °C)	150 days	Ultrapure water at pH = 6.5	Water bottled in soft PET	0.025	–	Reimann et al. (2010)
Refrigerated (2 °C)	150 days	Ultrapure water at pH = 3.5	Water bottled in hard PET	0.0085	–	Reimann et al. (2010)
Refrigerated (2 °C)	150 days	Ultrapure water at pH = 3.5	Water bottled in soft PET	0.027	–	Reimann et al. (2010)
r.t.	24 h, darkness	Ultrapure water at 100 °C	–	–	3.243–1.652	Cheng et al. (2010)
r.t.	24 h	Microwave heated ultrapure water	–	–	0.391–10.51	Cheng et al. (2010)
r.t	6 months	Groundwater	–	0.566	–	Shotyk et al. (2006)
r.t.	7 days, darkness	Ultrapure water at pH = 4	–	–	<0.02 to 3.794	Cheng et al. (2010)
22 °C	3 months	Commercial water	–	0.226 ± 0.160	–	Westerhoff et al. (2008)
22 °C	<1 year	Still mineral water	–	0.26 ± 0.160	–	Keresztes et al. (2009)
22 °C	<1 year	Sparkling mineral water	–	0.40 ± 0.22	–	Keresztes et al. (2009)
40 °C	10 days	Aqueous simulant	–	–	<0.03	Nishioka et al. (2002)
40 °C	45 °C	Spring still water	–	2.0	–	Bach et al. (2011)
40 °C	45 days	Carbonated mineral water	–	3.5	–	Bach et al. (2011)
80 °C	7 days	Commercial water	–	–	14.4	Westerhoff et al. (2008)
–	7 days, sunlight	Ultrapure water	–	–	<0.02 to 4.611	Cheng et al. (2010)
–	7 days, in-car storage	Ultrapure water	–	–	<0.02 to 3.08	Cheng et al. (2010)

r.t.: room temperature.

Author's personal copy

technology used (production of granules, preforms and bottle-blowing temperature) (Sugaya et al., 2001; Mutsuga et al., 2006; Choodum et al., 2007; Pinto and Reali, 2009). Mutsuga et al. (2005) found acetaldehyde levels in PET bottles from Japan, Europe and North America in ranging from 8.4 to 25.7 mg/kg, from 5.0 to 13.1 mg/kg and from 9.1 to 18.7 mg/kg, respectively. Traces of formaldehyde have also been found, ranging from 0.8 to 3.0 mg/kg, from <0.5 mg/kg to 1.6 mg/kg, and from <0.5 mg/kg to 1.2 mg/kg in the same Japanese, European and North American bottles, respectively. The highest levels of formaldehyde and acetaldehyde in Japanese bottles were attributed to the difference in formulations and in packaging production.

No traces of other carbonyl compounds have been found in bottle-grade PET.

2.3.2. *Studies of migration of carbonyl compounds into PET-bottled water*

The occurrence of carbonyl compounds in PET-bottled drinking water will be reviewed with respect to the significant factors affecting migration. The results of these studies are collected in Table 2.

SML values (EU, 2011) have only been established for formaldehyde and acetaldehyde: 15 mg/kg and 6 mg/kg, respectively. Propanal, butanal and acetone appear in positive list, but specific SMLs are not indicated. It is worth to note that none of the reviewed studies on PET-bottled water reached these values (see Table 2).

2.3.2.1. *Influence of the manufacturing technology and bottling process.* The different steps in the bottling process and bottle caps appear to be a source of pollution for some carbonyl compounds into bottled water. The monitoring of a production line of carbonated water showed the appearance of formaldehyde, acetaldehyde, propanal, nonanal, glyoxal, and methylglyoxal in ozonated water used to disinfect the bottles (Dabrowska et al., 2003). Also, polypropylene caps have been implicated as a source of carbonyl compounds, and particularly acetone, in bottled water, but with a less effect than PET packaging. To date, only Nawrocki et al. (2002) and Dabrowska et al. (2003) have detected acetone in PET-bottled water and they indicate that acetaldehyde and acetone are equally important compounds migrating into bottled water.

2.3.2.2. *Influence of contact time, temperature, pH, and CO_2 of bottled water.* Authors agree that the diffusion of formaldehyde and acetaldehyde is affected by temperature, storage time, and carbonation of water and its resulting lower pH in bottled drinking water (Nawrocki et al., 2002; Dabrowska et al., 2003; Ewender et al., 2003; Bach et al., 2011). However, Dabrowska et al. (2003) suggest that the pressure exerted by CO_2 on the PET wall promotes diffusion. However, Bach et al. (2011) have recently demonstrated that the CO_2 levels in sparkling water do not affect the migration of acetaldehyde from PET into bottled water.

In some diffusion studies, various authors have observed that acetaldehyde and also, formaldehyde in commercial still water and carbonated water disappears over time. Several hypotheses have been formulated to explain this occurrence. An old study suggests that oxygen or traces of metal ions in still mineral water could promotes the degradation of acetaldehyde over time and forms acetic acid, acetic anhydride, peracetic acid and trimer paraldehyde (Nijssen et al., 1996). However, this explanation is not convincing because anhydrides cannot form in aqueous solutions. Mutsuga et al. (2006) demonstrated the presence of heterotrophic bacteria in still water and these bacteria can decompose formaldehyde and acetaldehyde. Recently, Bach et al. (2011) reported that high mineralization of still water could prevent the release of acetaldehyde from PET. For carbonated water, Nawrocki et al. (2002) linked acetaldehyde disappearance to the gradual lost of dissolved CO_2 because bottles are not sufficiently gas-tight after long-term storage (8–9 months).

2.3.2.3. *Influence of exposure to sunlight.* Contrasting conclusions on the influence of the amounts of formaldehyde and acetaldehyde following exposure to sunlight have been drawn. Nawrocki et al. (2002) observed an increase in formaldehyde, acetaldehyde, and also acetone in carbonated water stored in PET bottles exposed to sunlight over a period of time. In contrast, Wegelin et al. (2001) observed the same level of formaldehyde in unexposed bottled water as in samples subjected to the maximum irradiation rate (548 kWh/m^2).

2.4. *Plasticizers*

The addition of plasticizers (phthalates and adipates) to plastic packaging is widespread to improve their softness and flexibility, especially in PVC (FSA, 2007; Cao, 2010).

Further, phthalates in food-contact materials are subject to strict regulations and are not thought to be use for manufacturing PET bottles. However, they have been found in PET material and in PET-bottled water.

We reviewed studies that report the amounts of phthalates and DEHA detected in PET-bottled water. The results of these studies are collected in Table 3.

It is important to note that in all reviewed studies, phthalate esters and DEHA did not exceed the SML values (EU, 2011) of 0.3 mg/kg, 30 mg/kg, 1.5 mg/kg and 18 mg/kg for DBP, BBP, DEHP and DEHA, respectively.

The major problems of phthalates lie in various sources of possible contamination. Phthalates may come from bottling lines (Higuchi et al., 2004), cap-sealing resins (Hirayama et al., 2001), or water treatment facilities (Leivadara et al., 2008; Montuori et al., 2008). Also, background pollution in the laboratory analyzing phthalates may also be a source (Fankhauser-Noti and Grob, 2007). Moreover, in recent studies, no traces of phthalates (DMP, DBP, BBP, DEHP) were detected into water after incubation at 40 °C for 10 days (Ceretti et al., 2010; Guart et al., 2011).

However, previous reports have claimed that phthalates can come from PET bottles, but convincing explanations have never been offered. Comparing the results of analyses of bottled water before and after storage, Casajuana and Lacorte (2003) concluded that poor storage conditions (10 weeks outdoors at temperatures of up 30 °C) increases the concentrations of DBP, BBP and DEHP in bottled water. Montuori et al. (2008) found that the concentrations of phthalates (PhA, DMP, DEP, DiBP, DBP and DEHP) in samples bottled in PET were 20

Author's personal copy

Table 2 – Results of carbonyl compounds migration from PET into bottled water.

Compound Name	Simulant	Exposure temperature	Exposure conditions	Other parameters	Concentration range (μg/L)	Concentration mean (μg/L)	References
Formaldehyde	Mineral water	–	–	–	<0.5 to 59	–	Sugaya et al. (2001)
	Still water	–	–	Total organic carbon	2.2–64.6	–	Nawrocki et al. (2002)
	Still water	–	–	<2.0 to 2.9 μg/g in PET	<5.0 to 27.9	–	Mutsuga et al. (2006)
	Still water	r.t.	6 days	–	–	7.1 ± 0.7	Dabrowska et al. (2003)
	Still mineral water	–	63 days, sunlight	–	–	44	Wegelin et al. (2001)
	Still mineral water	–	126 days, sunlight	–	–	1	Wegelin et al. (2001)
	Carbonated water	r.t.	170 days	–	–	60.0 ± 6.0	Dabrowska et al. (2003)
	Carbonated water at pH = 4.5	r.t.	6 days	–	–	10.5 ± 1.1	Dabrowska et al. (2003)
	Carbonated water	–	–	TOC	24.6–96.1	–	Nawrocki et al. (2002)
	Carbonated water	–	–	<0.5 to 0.9 μg/g in PET	<5.0 to 13.7	–	Mutsuga et al. (2006)
	Carbonated water	–	–	–	–	1.4 ± 0.1	Mutsuga et al. (2006)
Acetaldehyde	Mineral water	–	–	–	<0.5 to 59	–	Sugaya et al. (2001)
	Mineral water	–	–	–	<0.5 to 260	–	Sugaya et al. (2001)
	Mineral water	–	–	–	<0.5 to 0.9	–	Sugaya et al. (2001)
	Mineral water	–	–	–	<0.5 to 0.3	–	Sugaya et al. (2001)
	Still water	–	–	TOC	0.9–133.8	–	Nawrocki et al. (2002)
	Still water	–	–	<2.0 to 2.9 μg/g in PET	<5.0 to 107.8	–	Mutsuga et al. (2006)
	Still water	r.t.	6 days	–	–	4.8 ± 0.5	Dabrowska et al. (2003)
	Still mineral water	–	63 days, sunlight	–	–	3	Wegelin et al. (2001)
	Still mineral water	–	126 days, sunlight	–	–	2	Wegelin et al. (2001)
	Still mineral water	40 °C	10 days	–	<2	–	Ceretti et al. (2010)
	Carbonated water	–	–	TOC	4.7–317.8	–	Nawrocki et al. (2002)
	Carbonated water	–	–	0.5–0.9 μg/g in PET	<5.0 to 46.9	–	Mutsuga et al. (2006)
	Carbonated water at pH = 4.5	r.t.	6 days	–	–	24.6 ± 2.5	Dabrowska et al. (2003)
	Carbonated water	r.t.	170 days	–	–	78.1 ± 7.8	Dabrowska et al. (2003)
	Carbonated water	r.t.	5 weeks	CO_2 content: 3.88 g/L	–	28.0 ± 2.8	Dabrowska et al. (2003)
	Carbonated water	r.t.	5 weeks	CO_2 content: 4.53 g/L	–	52.0 ± 5.2	Dabrowska et al. (2003)
	Carbonated water	r.t.	5 weeks	CO_2 content: 6.40 g/L	–	79.0 ± 7.9	Dabrowska et al. (2003)
	Carbonated water	40 °C	10 days	–	<2	–	Ceretti et al. (2010)
Propanal	Mineral water	–	–	–	<0.5 to 0.9	–	Sugaya et al. (2001)
	Carbonated water	–	–	–	–	<0.05	Dabrowska et al. (2003)
Butanal	Mineral Water	–	–	–	<0.5 to 0.3	–	Sugaya et al. (2001)
Nonanal	Still water	–	–	TOC	0.9–11.3	–	Nawrocki et al. (2002)
	Carbonated water	–	–	TOC	0.95–7.9	–	Nawrocki et al. (2002)
	Carbonated water	–	–	–	–	<0.05	Dabrowska et al. (2003)
Glyoxal	Still water	–	–	TOC	–	5.9	Nawrocki et al. (2002)
	Carbonated water	–	–	TOC	–	0.9	Nawrocki et al. (2002)
	Carbonated water	–	–	–	–	<0.05	Dabrowska et al. (2003)
Methylglyoxal	Still water	–	–	TOC	0.9–15.8	–	Sugaya et al. (2001)
	Carbonated water	–	–	TOC	0.8–4.6	–	Sugaya et al. (2001)
Acetone	Still water	–	–	TOC	5.1–107.6	–	Nawrocki et al. (2002)
	Carbonated water	–	–	TOC	16.8–125.6	–	Nawrocki et al. (2002)

r.t: room temperature; TOC: total organic carbon; n.d.: not detected.

Author's personal copy

Table 3 – Results of phthalate esters migration from PET into bottled water.

Compound name	Simulant	Exposure temperature	Exposure conditions	Concentration range (μg/L)	Concentration mean (μg/L)	References
DMP	Still water	–	–	<0.012	–	Cao (2008)
	Mineral water	22 °C	30 days	<0.04	–	Bošnir et al. (2007)
	Water	Up to 30 °C	10 weeks	<0.002 to 0.003	0.002	Casajuana and Lacorte (2003)
DEP	Still water	Refrigerated	–	0.054–0.1	0.077 ± 0.016	Cao (2008)
	Mineral water	22 °C	30 days	<0.04 to 1	0.11	Bošnir et al. (2007)
	Water	Up to 30 °C	10 weeks	0.082–0.355	0.214	Casajuana and Lacorte (2003)
DBP	Still water	Refrigerated	–	0.08–0.32	0.357 ± 0.606	Cao (2008)
	Mineral water	22 °C	30 days	<0.04 to 50	11	Bošnir et al. (2007)
	Water	Up to 30 °C	10 weeks	0.020–0.070	0.046	Casajuana and Lacorte (2003)
DiBP	Still water	Refrigerated	–	0.13–0.35	0.225 ± 0.081	Cao (2008)
BBP	Still water	–	–	<0.085	–	Cao (2008)
	Mineral water	22 °C	30 days	<0.005	–	Bošnir et al. (2007)
	Water	Up to 30 °C	10 weeks	<0.004 to 0.010	<0.004	Casajuana and Lacorte (2003)
DEHP	Dionised water	r.t.	17 h, darkness	0.14–0.24	0.19 ± 0.05	Schmid et al. (2008)
	Dionised water	r.t.	17 h, sunlight	0.10–0.38	0.26 ± 0.10	Schmid et al. (2008)
	Dionised water	60 °C	17 h, sunlight	0.15–0.71	0.36 ± 0.21	Schmid et al. (2008)
	Still water	–	–	0.05–0.093	0.102 ± 0.055	Cao (2008)
	Mineral water	r.t.	3 months	<0.02 to 6.8	–	Leivadara et al. (2008)
	Mineral water	22 °C	30 days	<0.04 to 50	8.8	Bošnir et al. (2007)
	Water	Up to 30 °C	10 weeks	<0.002 to 0.188	134	Casajuana and Lacorte (2003)
	Mineral water	Up to 30 °C	3 months, sunlight	<0.02	–	Leivadara et al. (2008)
DHP	Still water	–	–	<0.036	–	Cao (2008)
DOP	Still water	–	–	<0.003	–	Cao (2008)
	Mineral water	22 °C	30 days	<0.04	–	Bošnir et al. (2007)

DMP: dimethyl phthalate; DEP: diethyl phthalate; DBP: dibutyl phthalate; DiBP: di-iso-butyl phthalate; BBP: benzylbutyl phthalate; DEHP: di-2-ethylbutyl phthalate; DHP: dihexyl phthalate; DOP: dioctyl phthalate; r.t.: room temperature.

times higher than in those from glass bottles directly analyzed after purchased. However, no correlation between the physico-chemical water properties and phthalate migration has been found. Nevertheless, phthalate levels detected in still mineral water are slightly higher than in sparkling water.

Several studies have provided data on phthalates levels in bottled water immediately after purchase; the initial levels are frequently lower than 0.4 μg/L (Peñalver et al., 2000; Kayali et al., 2006; Montuori et al., 2008).

The effect of pH and sunlight exposure on phthalate migration has also been studied. Bošnir et al. (2007) suggest that acidic pH stimulates the diffusion of phthalates. Schmid et al. (2008) and Amiridou and Voutsa (2011) concluded that plasticizers migration in outdoor conditions is not substantial.

Regarding the occurrence of DEHA in PET-bottled water, Serôdio and Nogueira (2006) found that DEHA concentrations in bottled water (0.15 μg/L) are slightly higher than in tap water (0.09 μg/L), but this difference is not significant. The effect of sunlight exposure and temperature related to DEHA levels in PET-bottled water has been investigated (Schmid et al., 2008). Slight differences in DEHA amounts in PET-bottled water have been observed in association with high temperatures and in samples from different countries.

In conclusion, the plasticizers present in packaged food do not necessarily mean that these compounds will be present in packaging material (Page and Lacroix, 1995). In addition, it is worth to note that phthalates and adipates are not used in PET. More investigations are needed to improve the accuracy of the analytical methods and to clarify the entry pathways of plasticizers in the bottling line.

2.5. *Antioxidants*

Small amounts of these additives can be added to the polymer before it is processed to inhibit or reduce the oxidation of plastic material. However, PET bottles intended for water are usually manufactured without antioxidants (Zweifel, 2001).

2.5.1. *Alkylphenols*

In food packaging manufacture, alkylphenols, such as 4-nonylphenol (NP), and octylphenol (OP), can be generated by oxidation of tris(nonylphenyl)phosphite (TNPP) (additive) or by degradation of polyethoxylated nonylphenols (APEOs), which are cleaning agents in bottle manufacturing (McNeal et al., 2000; Casajuana and Lacorte, 2003). Alkylphenols are known to be endocrine disrupters (Loos et al., 2007; Baugros et al., 2009). SMLs have not been established for NP and OP.

In the case of PET containers, either NP is not detected (Casajuana and Lacorte, 2003; Fernandes et al., 2008) or the authors doubt whether these containers are a source of alkylphenols (Toyo'oka and Oshige, 2000; Loyo-Rosales et al., 2004).

When NP or OP is found in bottled water, it is always at low levels, ranging from 1 to 20 ng/L (Amiridou and Voutsa, 2011; Guart et al., 2011). Only Li et al. (2010) found NP concentrations ranging from 108 to 298 ng/L in bottled water, but the

Author's personal copy

material which the water container was made (PVC, PE or PET) was not specified, thus making this study not reliable.

It is important to note that the source of alkylphenols may be the antioxidants in laboratory equipment and materials (vessels, tubes, detergents, etc.), the water itself, or pollution during the container washing steps when the packaging was manufactured. Consequently, the slight amounts of alkylphenols in bottled water cannot be directly attributed to PET.

2.5.2. *Butylated hydroxytoluene (BHT)*

BHT is a phenolic antioxidant used as a thermostabilizer for PE, PP, polyesters and PVC (Sheftel, 2000).

In all reviewed studies, BHT amounts in PET-bottled water are much lower than the established SML of 3 mg/kg (EU, 2011).

Tombesi and Freije (2002) found BHT amounts ranging from 21 to 38 μg/L in PET-bottled water. Later on, the same research group (Tombesi et al., 2004), again detected BHT, but amounts were 10 times lower than in the first studies. It should be mentioned that their first results are not reproducible. Further, Higuchi et al. (2004) found only BHT in glass-bottled water (2.5 μg/L) concluding that the origin of this compound is the PE bottle caps. This conclusion seems to be logical because this additive may be used in the production of PE.

2.6. *UV stabilizers*

Light stabilizers based on benzotriazoles are used in the production of PET packaging in some markets (FSA, 2007). The SMLs of Tinuvin 234 and Tinuvin P are set at 1.5 mg/kg and 6 mg/kg, respectively (EU, 2011).

Studies of benzotriazole stabilizers in PET and bottled water are pretty old and are now inaccurate due to the changes in PET manufacture over the years. Further, the migration potential of stabilizers is not noteworthy due to their insolubility into water.

2.7. *Lubricants*

Lubricants are used for the production of plastic packaging to minimize adhesion, to reduce friction, or to promote the elasticity of plastics (Zweifel, 2001). European Regulation No. 10/2011 authorizes the use of erucamide and oleamide for the manufacture of food-contact packaging. No specific SMLs have been prescribed for these substances. Only old studies have found these two compounds in PET-bottled water (Buiarelli et al., 1993; Monteiro et al., 1996). More recently, Strube et al. (2009) attributed several volatile compounds found in PET-bottled water after sunlight exposure to photo-oxidation products of erucamide present in bottle closures. Unfortunately, the closures material was not analyzed and this hypothesis could not be confirmed.

2.8. *Bisphenol A*

Bisphenol A (BPA) is a moiety used in the manufacture of PC for food packaging. It is known to be an endocrine-disrupting chemical that may cause harmful effects in animals and probably in humans (Berryman et al., 2004). A total daily intake (TDI) for BPA of 0.05 mg/kg/body weight (EFSA, 2008) and an SML of 0.6 mg/kg have been established. In the reviewed studies, BPA levels found in bottled water varies greatly and concentrations fall in the range of a few ng/L. Therefore, BPA values calculated for a consumption of 2 L per day for an adult weighting 60 kg does not exceed the TDI.

Furthermore, few publications have been devoted to the investigation of BPA in bottled water, as BPA is not used in the manufacture of PET. BPA concentrations remain constants (Toyo'oka and Oshige, 2000) or increase slightly (Casajuana and Lacorte, 2003) before and after heating PET-bottled water. Therefore, it is difficult to incriminate PET material as a source of BPA.

A recent study (Amiridou and Voutsa, 2011) found low BPA concentrations (up to 4 ng/L) in PET-bottled water before and after sunlight exposure. In contrast, Shao et al. (2005) and Guart et al. (2011) did not detect this compound in PET-bottled water.

It has been suggested that the source of BPA in PET-bottled water could be due to bottle closures (Guart et al., 2011), the water itself (polluted prior to bottling) (Li et al., 2010), or the use of recycled PET (Sax, 2010).

3. Toxicological evaluation of PET-bottled water

Although, food-contact packaging is strictly controlled by European regulations (EU, 2004, 2011), it has been suggested that food packaging may leach estrogenic substances (Muncke, 2009; Yang et al., 2011). Although controversial, PET has been designated as a possible source (Pinto and Reali, 2009; Sax, 2010; Wagner and Oehlmann, 2011).

3.1. *Genotoxicity assays*

The Ames test was performed by Monarca et al. (1994) on carbonated water kept in PET bottles. The mineral water was concentrated using C18 cartridges after daylight storage (1, 3, 6 months at room temperature). The results for the concentrated extracts showed no mutagenic activity with Salmonella strains TA 98 and TA 100 (with and without S9), whatever the time periods. In parallel, several compounds were detected in distilled water stored in PET bottles, namely acetaldehyde, acetic acid, propanal, terephtalic acid, dimethylterephthalate, phenol-2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4,4-methyl and 1,2-benzenedicarboxylic acid butyl-2-methyl-propyl ester.

Other authors have investigated the genotoxicity of PET-bottled water after exposure to daylight and temperature. Evandri et al. (2000) observed an increase of chromosomic aberrations in *Allium cepa* with PET water samples exposed to direct sunlight for 16 weeks (two-fold induction) and exposed in the dark at 40 °C for 10 days (three-fold induction). Although, these aberrations were attributed to the migration of volatile compounds into PET-bottled water, the chemical analysis of water was not done. Further, the results may be not representative because very few PET brands were tested. Biscardi et al. (2003) performed the *Tradescantia* micronucleus bioassay and the Comet assay with human leucocytes in lyophilized water stored in PET bottles. Only samples stored for 2 months showed an eight-fold increase in the frequency of micronuclei compared to distilled water. Also, significant

Author's personal copy

DNA damage in human cells was observed only in PET-bottled water collected directly in the bottling plant. It was suggested that the distribution pipelines in the bottling plant were a source of mutagens in mineral water. In parallel, the same authors identified DEHP in the acetone extracts of still and carbonated mineral water in concentrations ranging from 0.4 to 3.2 mg/L after 9 to 10 months of storage. These elevated values of DEHP are clearly a problem of contamination in the laboratory environment or reagents. Furthermore, DEHP is not genotoxic (Dybing, 2002); its presence cannot explain the observed toxic effect; consequently, this study can be disregarded.

In contrast, using human cells (HULYs), Ergene et al. (2008) did not observe any significant effect on sister chromatid exchange for spring water and purified water stored in PET for 8 weeks after bottling, but they noticed a cytostatic effect. Ceretti et al. (2010) found that genotoxic effects may be associated with the mineral and CO_2 content of the water using the *Tradescantia* micronucleus test and *A. cepa* assay. Again these findings should be interpreted with caution because of the small number of samples tested.

Furthermore, media must be buffered to prevent false positive responses in the assay due to a change in extracellular pH. Water conductivity must also be checked to ensure that the physico-chemical properties of the water itself are not of the cause of the positive response.

3.2. *Endocrine disruptor assays*

Endocrine disruptors are compounds that mimic or antagonize the actions of natural estrogens, and are the most common form of endocrine disruptor activity (ICCVAM, 2003, 2006). These compounds alter the hormone system involved in many biological metabolisms and can produce many health-related problems, such as early puberty in females, reduced sperm counts, altered function of reproductive organs, obesity, altered gender-specific behaviors, and increased rates of some breast, ovarian, testicular, and prostate cancers (Newbold et al., 2004; Della Seta et al., 2006; Patisaul et al., 2009).

Some authors have reported estrogenic activity in mineral water in PET bottles, using bioassays such as the E-screen assay (MCF-7 cell line) and yeast estrogen assay (*Saccharomyces cerevisae*) expressing the human estrogen receptor α (ERα). Estrogenic activity has also been evaluated using a reproduction test performed with mudsnails, *Potamopyrgus antipodarum* (Pinto and Reali, 2009; Wagner and Oehlmann, 2009; Sax, 2010; Wagner and Oehlmann, 2011). All, these studies suggested the presence of endocrine disruptors in PET-bottled water.

Contamination of bottled water by endocrine disruptors could occur during the different steps of the bottling process, namely untreated groundwater from a spring, supply pipes or the filling and cleaning of containers in the bottling process (Montuori et al., 2008; Wagner and Oehlmann, 2009; Sax, 2010). Furthermore, for Yang et al. (2011) stress (UV radiation and heat) applied to the plastic material could also be a source of endocrine disruptors. Dissolved salts in water have been also pointed out as responsible for estrogenic activity (Criado et al., 2005).

Some authors have suggested several compounds as being the source of hormonal activity. As shown in Section 2.4, phthalates have been detected in PET-bottled water (Casajuana and Lacorte, 2003; Bošnir et al., 2007; Montuori et al., 2008). However, phthalates are not used as additives in the manufacturing of PET bottles (ILSI, 2000). Furthermore, contamination cannot be excluded in these studies, as they did not prove the absence of phthalates in mineral water and soft drinks before bottling. In any case, even if they had been present individually, the estrogenic activity of these compounds is too weak (Jobling et al., 1995), particularly for DEHP, to explain these data.

As reported in Section 2.2, Sb has been found in PET-bottled water. Sax (2010) mentioned that Sb could be also a source of estrogenicity. Indeed, Choe et al. (2003) observed a high estrogenicity of antimony trichloride ($SbCl_3$) using the estrogen receptor-dependant transcriptional expression assay and the E-screen test. However, the most common catalyst used in PET synthesis is the Sb_2O_3, not the $SbCl_3$ (Biros et al., 2002; Duh, 2002).

Recently, Yang et al. (2011) claim that all plastics subjected to "stress" could leach xeno-estrogenic substances, even those that have no estrogenic activity in the initial step (formulation). The estrogenic activity of PET water bottles was evaluated by an E-screen assay using MCF-7 cells. The saline extracts of PET show estrogenic activity (RME response > 15%) in all stress conditions (microwave, sunlight, autoclave). However, no chemical analyses were performed in parallel to identify the compounds involved in the observed effect.

For other authors, estrogenicity may be due to the use of recycled PET (Safa, 1999). Sax (2010) suggests that the DMP concentration in PET-bottled soda detected by Bošnir et al. (2007) may be due to the use of recycled PET coming from shampoo bottles and intended for bottling of soft drinks.

Furthermore, the extraction efficiency of estrogen-like compounds from bottled water depends on the water preparation techniques (SPE, evaporation) (Wagner and Oehlmann, 2011).

In each case, when biological data were provided there was insufficient analytical data to enable us to draw a conclusion.

Pinto and Reali (2009) report low estrogenic activity, but with great variability, in nine Italian brands of PET-bottled water using a yeast estrogen screen (YES) bioassay. The water samples were concentrated using C18 cartridges and the extracts were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Although, higher estrogenic activity was observed in one brand of mineral water (23.1 ng/L estradiol equivalents (EEQ)), in the other brands, hormonal activity was often found to be in the same range as for tap and surface water (15–17 ng/L EEQ).

Another research group, Wagner and Oehlmann (2009) tested 18 brands of PET- and glass-bottled water using the YES assay. Compared to glass, a weak increase in the estrogenic activity in PET-bottled water was observed in three of four brands with a maximum value of 75.2 ng/L of EEQ. The parthenogenetic generation of mud snail embryos (*Potamopyrgus antipodum*) cultured on PET bottles was investigated. Although the differences were not statistically significant, the authors claim that the production of embryos per female increased slightly on PET bottles suggesting that estrogenic contamination comes from PET packaging. However, no correlation was observed with similar brands between both

Author's personal copy

assays and nothing proved whether the effect was really due to PET or to contamination. Furthermore, the American Chemistry Council (ACC, 2009) reports that PET is not a source of estrogenic compounds.

More recently, Wagner and Oehlmann (2011), in a follow-up of their previous article, reported that C18 cartridges and the evaporation of extracts with DMSO entrap more estrogenic compounds. The authors suggested that volatile compounds retained in DMSO could be the cause of the higher estrogenic activity. Using the E-screen assay, with optimized sample preparation (C18 cartridges and evaporation with DMSO), estrogenic activity in PET-bottled water was three-fold higher than in glass-bottled water. However, it is important to note that this concentration of EEQs with E-screen assay is about a factor 15,000 lower than the estrogenic activity found in their previous paper with the YES assay. Further, other studies using the E-screen bioassay cannot confirm the presence of endocrine activity in PET-bottled water (Böhmler et al., 2006; Bopp et al., 2010; Brüschweiler, 2011).

Unfortunately, the Wagner and Oehlmann (2011) study did not provide any analytical data, underlying the need to combine chemical analysis with bioassays to clearly identify these compounds and to understand the potential risk of exposure for humans.

Also, using theoretical models of migration with potential xeno-estrogenic candidates such as nonylphenol and BPA, Franz and Welle (2009) rule out PET packaging as being responsible for this observed hormonal activity. They suggest that the estrogenic potency of the endocrine disruptors alone is too low to explain this observed hormonal activity. Consequently, a chemical mixture, or "cocktail effect", and/or unknown compounds (NIAS) could be the source of the estrogenic activity observed, with low concentrations of endocrine disruptors giving rise to a synergistic effect (Muncke, 2009).

4. Discussion and conclusions

Although food-contact packaging is strictly regulated (EU, 2004, 2011), the detection of contaminants released from plastic materials is controversial, particularly regarding estrogenic activity. As we have highlighted in this review, PET has also been incriminated.

Throughout this review, we have made it clear that studies use different storage conditions to evaluate the migration of compounds from PET into bottled water. Different analytical methods with sensitive detection limits have been employed to identify or/and quantify these substances in a large variety of PET bottles. Since migration depends directly on these factors, it is difficult or even impossible to compare data from these different studies, leading to controversial interpretation of results. The same is true for the toxicological studies performed on bottled drinking water. Depending on the type of assay (yeast, human cell lines, snails, plants systems, etc.) and sample preparation (lyophilized, concentrated, etc.) different conclusions can be drawn. Further, plant systems (*A. cepa*, *Tradescandia*) are not considered as primary screening tools by current international guidelines for mammalian systems, making extrapolation very difficult (Evandri et al., 2000).

The cyto-/genotoxic effects and the endocrine disruptors activities observed *in vitro* by some authors have raised doubts and revealed discrepancies in the debate on quality and the safety of PET-bottled water.

Regarding any potential estrogenic activity, a 'cocktail' effect in bottled drinking water with compounds having weak endocrine-disrupting properties and/or water mineral content may explain the reported positive results (Muncke, 2009).

Also, it is important to specify that very few studies combined both chemical water analysis and toxicological evaluation in the same investigation on PET-bottled water.

It is now assumed, and all scientific reports agree, that formaldehyde, acetaldehyde and antimony are related to PET and can migrate into the bottled water depending on certain storage parameters and types of drinking water (Nawrocki et al., 2002; Dabrowska et al., 2003; Mutsuga et al., 2006; Shotyk and Krachler, 2007; Westerhoff et al., 2008; Keresztes et al., 2009).

Apart from these well-known compounds, which usually do not pose a human health risk, we conclude that it is necessary to be cautious before claiming that there is a direct link between PET use and the compounds found in bottled drinking water.

PET is the polymer which uses the least additives (ILSI, 2000). Phthalates, alkylphenols, antioxidants, UV stabilizers, lubricants and carbonyl compounds in PET-bottled water could come from several sources, namely bottle closures, transport pipelines, disinfection agents, background pollution in analytical methods and the bottling process itself or even environmental pollution. Their presence in glass-bottled water, as demonstrated by some authors, is another reason to believe that there may be other sources than PET.

Less is known about NIAS (byproducts, impurities, etc.) in PET bottles and these substances can also migrate into bottled drinking water (Skjevrak et al., 2005; Grob et al., 2006; Franz and Welle, 2008; Muncke, 2009). However, NIAS can be present in any food-contact material.

More comparable and reliable information on chemical mixtures and the effect observed in the PET-bottled drinking water is necessary before concluding that there is a potential human health risk. Bioassays are complementary tools of chemical analyses. They are useful as screening tools to detect potential toxic effects due to NIAS and/or chemical mixtures. However, human cells lines are more relevant and the answer should be placed in a physiological context of the organism. The use of these bioassays must also be standardized (CEN-OCDE guidelines, etc.). Further, it is necessary to combine toxicological data and chemical analysis, especially when the responses are positive, and to determine the possible entry pathways and concentration of compounds.

REFERENCES

ACC, 2009. American Chemistry Council. Phthalates Information Center. Available: http://www.phthalates.americanchemistry.com (accessed 07.07.11).

Amiridou, D., Voutsa, D., 2011. Alkylphenols and phthalates in bottled waters. Journal of Hazardous Materials 185 (1), 281–286.

Author's personal copy

Bach, C., Dauchy, X., David, L., Etienne, S., 2011. Physico-chemical study of PET bottles and PET bottled water. Matériaux & Techniques 99, 391–408 (in French).
Baugros, J.B., Cren-Olivé, C., Giroud, B., Gauvrit, J.Y., Lantéri, P., Grenier-Loustalot, M.F., 2009. Optimisation of pressurised liquid extraction by experimental design for quantification of pesticides and alkyl phenols in sludge, suspended materials and atmospheric fallout by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1216 (25), 4941–4949.
Berryman, D., Houde, F., DeBlois, C., O'Shea, M., 2004. Nonylphenolic compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluents: a survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life. Chemosphere 56 (3), 247–255.
Biros, S.M., Bridgewater, B.M., Villeges-Estrada, A., Tanski, J.M., Parkin, G., 2002. Antimony ethylene glycolate and catecholate compounds: structural characterization of polyesterification catalysts. Inorganic Chemistry 41, 4051–4057.
Biscardi, D., Monarca, S., De Fusco, R., Senatore, F., Poli, P., Buschini, A., Rossi, C., Zani, C., 2003. Evaluation of the migration of mutagens/carcinogens from PET bottles into mineral water by Tradescantia/micronuclei test, Comet assay on leukocytes and GC/MS. Science of the Total Environment 302 (1–3), 101–108.
Böhmler, G., Kohnen, R., Borowski, U., Rühe, A., 2006. Einsatz eines biologischen Testsystems (E-Screen) in der amtlichen Lebensmittelüberwachung zum Nachweis estrogen wirksamer Substanzen. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 1 (4), 325–331.
Bopp, K., Bertram, K., Roth, M., 2010. Hormonelle aktivität in natürlich mineralwässern? Deutsche Lebensmittel-Rundschau 106, 489–500.
Bošnir, J., Puntarić, D., Galić, A., Škes, I., Dijanić, T., Klarić, M., Grgić, M., Čurković, M., Šmit, Z., 2007. Migration of phthalates from plastic containers into soft drinks and mineral water. Food Technology and Biotechnology 45 (1), 91–95.
Brüschweiler, B., 2011. Des perturbateurs endocriniens dans les eaux minérales en bouteille? Federal Office of Public Health (FOPH). Bulletin 14/11, 311–317 Available: http://www.bag.admin.ch/.
Buiarelli, F., Cartoni, G., Cocciolo, F., 1993. HPLC and GC–MS detection of compounds released to mineral waters stored in plastic bottles of PET and PVC. Annali di Chimica 83 (3–4), 93–104 (in Italian).
Cao, X.L., 2008. Determination of phthalates and adipate in bottled water by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1178 (1–2), 231–238.
Cao, X.L., 2010. Phthalate esters in foods: sources, occurrence, and analytical methods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 9 (1), 21–43.
Casajuana, N., Lacorte, S., 2003. Presence and release of phthalic esters and other endocrine disrupting compounds in drinking water. Chromatographia 57 (9–10), 649–655.
Ceretti, E., Zani, C., Zerbini, I., Guzzella, L., Scaglia, M., Bema, V., Donato, F., Monarca, S., Feretti, D., 2010. Comparative assessment of genotoxicity of mineral water packed in polyethylene terephthalate (PET) and glass bottles. Water Research 44 (5), 1462–1470.
Cheng, X., Shi, H., Adams, C.D., Ma, Y., 2010. Assessment of metal contaminations leaching out from recycling plastic bottles upon treatments. Environmental Science and Pollution Research 17 (7), 1323–1330.
Choe, S.Y., Kim, S.J., Kim, H.G., Lee, J.H., Choi, Y., Lee, H., Kim, H., 2003. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. The Science of the Total Environment 312 (1–3), 15–21.
Choodum, A., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., 2007. Acetaldehyde residue in polyethylene terephthalate (PET) bottles. Journal of Environmental Science and Health – Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes 42 (5), 577–583.
Criado, M.V., Fernández Pinto, V.E., Badessari, A., Cabral, D., 2005. Conditions that regulate the growth of moulds inoculated into bottled mineral water. International Journal of Food Microbiology 99 (3), 343–349.
Dabrowska, A., Borcz, A., Nawrocki, J., 2003. Aldehyde contamination of mineral water stored in PET bottles. Food Additives and Contaminants 20 (12), 1170–1177.
Della Seta, D., Minder, I., Belloni, V., Aloisi, A.M., Dessi-Fulgheri, F., Farabollini, F., 2006. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. Hormones and Behaviour 50 (2), 301–307.
Duh, B., 2002. Effect of antimony catalyst on solid-state polycondensation of poly(ethylene terephthalate). Polymer 43 (11), 3147–3154.
Dybing, E., 2002. Development and implementation of the IPCS conceptual framework for evaluating mode of action of chemical carcinogens. Toxicology 181–182, 121–125.
Dzięcioł, M., Trzeszczyński, J., 2000. Volatile products of poly(ethylene terephthalate) thermal degradation in nitrogen atmosphere. Journal of Applied Polymer Science 77 (9), 1894–1901.
EFBW, 2011. European Federation of Bottled Water. http://www.efbw.eu/ (accessed 21.10.11).
EFSA, 2011. Scientific opinion on the criteria to be used for safety evaluation of a mechanical recycling process to produce recycled PET intended to be used for manufacture of materials and articles in contact with food. EFSA Journal 9 (7), 2184, 25 pp.
EFSA, 2008. Statement of EFSA on a study associating bisphenol A with medical disorders. The EFSA Journal Available: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/838.htm.
Ergene, S., Çelik, A., Çavaş, T., Köleli, N., Aymak, C., 2008. The evaluation of toxicity and mutagenicity of various drinking waters in the human blood lymphocytes (HULYs) in vitro. Food and Chemical Toxicology 46 (7), 2472–2475.
EU, 2011. Commission regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come in contact with food. Official Journal of the European Commission.
EU, 2008. European Union Risk Assessment Report Diantimony Trioxide. CAS No: 1309-64-4, EINECS No: 215-175-0. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
EU, 2004. Regulation No 1935/2004 of the European Parliament and of the council of 27 October 2004 on materials intended to come into contact with food and repealing directives 80/590/EEC and 89/109/EEC.
Evandri, M.G., Tucci, P., Bolle, P., 2000. Toxicological evaluation of commercial mineral water bottled in polyethylene terephthalate: a cytogenetic approach with *Allium cepa*. Food Additives and Contaminants 17 (12), 1037–1045.
Ewender, J., Franz, R., Mauer, A., Welle, F., 2003. Determination of the migration of acetaldehyde from pet bottles into non-carbonated and carbonated mineral water. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 99 (6), 215–221.
Fakirov, S., 2002. Handbook of Thermoplastic Polyesters. Wiley-VCH, Weinheim (Germany).
Fankhauser-Noti, A., Grob, K., 2007. Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: investigation of the sources, tips and tricks. Analytica Chimica Acta 582 (2), 353–360.
Fernandes, A.R., Rose, M., Charlton, C., 2008. 4-Nonylphenol (NP) in food-contact materials: analytical methodology and occurrence. Food Additives and Contaminants 25 (3), 364–372.
Franz, R., Welle, F., 2009. Can migration of endocrine disruptors from plastic bottles be the cause of estrogenic burden recently

Author's personal copy

determined in bottled mineral water? Deutsche Lebensmittel-Rundschau 105 (5), 315–318.
Franz, R., Welle, F., 2008. Investigation of non-intentionally added substances (NIAS) in PET bottles and closures. In: Poster Presentation at the 4th International Symposium on Food Packaging, 19–21 November, Prague, Czech Republic.
FSA, 2007. Report FD07/01: An Investigation into the Reaction and Breakdown Products from Starting Substances Used to Produce Food Contact Plastics. Food Standards Agency, London (United Kingdom).
Grob, K., Biedermann, M., Scherbaum, G., Roth, M., Rieger, K., 2006. Food contamination with organic materials in perspective: packaging materials as the largest and least controlled source? A view focusing on the European situation. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 46 (7), 529–536.
Guart, A., Bono-Blay, F., Borrell, A., Lacorte, S., 2011. Migration of plasticizers phthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. Food Additives & Contaminants 28 (5), 1–10.
Higuchi, A., Yoon, B.O., Kaneko, T., Hara, M., Maekawa, M., Nohmi, T., 2004. Separation of endocrine disruptors from aqueous solutions by pervaporation: dioctylphthalate and butylated hydroxytoluene in mineral water. Journal of Applied Polymer Science 94 (4), 1737–1742.
Hirayama, K., Tanaka, H., Kawana, K., Tani, T., Nakazawa, H., 2001. Analysis of plasticizers in cap-sealing resins for bottled foods. Food Additives and Contaminants 18 (4), 357–362.
Holland, B.J., Hay, J.N., 2002a. Analysis of comonomer content and cyclic oligomers of poly(ethylene terephthalate). Polymer 43 (6), 1797–1804.
Holland, B.J., Hay, J.N., 2002b. The thermal degradation of PET and analogous polyesters measured by thermal analysis-Fourier transform infrared spectroscopy. Polymer 43 (6), 1835–1847.
ICCVAM, September, 2006. Addendum to ICCVAM, Evaluation of *In vitro* Test Methods for Detection Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays NIH Pub 03-4503. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/EDAddendFinal.pdf (accessed 07.07.11).
ICCVAM, May, 2003. ICCVAM, Evaluation of In vitro Test Methods for Detection Potential Endocrine Disruptors: estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays NIH Pub 03-4503. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/edfinalrpt0503/edfinrpt.pdf (accessed 07.07.11).
ILSI, 2000. Packaging Materials: 1. Polyethylene Terephthalate (PET) for Food Packaging Applications. International Life Science Institute, Brussels, Belgium.
Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Mathiessen, P., Sumpter, J.P., 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalates plasticizers, are weakly estrogenic. Environmental Health Perspectives 103 (6), 582–587.
Kayali, N., Tamayo, F.G., Polo-Díez, L.M., 2006. Determination of diethylhexyl phthalate in water by solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography. Talanta 69 (5), 1095–1099.
Keresztes, S., Tatár, E., Mihucz, V.G., Virág, I., Majdik, C., Záray, G., 2009. Leaching of antimony from polyethylene terephthalate (PET) bottles into mineral water. Science of the Total Environment 407 (16), 4731–4735.
Kovarskaya, B.M., Levantovska, I.I., Blyumenfel'd, A.B., Dralyuk, G.V., 1968. Thermooxidative degradation of poly(ethylene terephthalate). Plasticheskie Massy 5, 42–46 (in Russian).
Leivadara, S.V., Nikolaou, A.D., Lekkas, T.D., 2008. Determination of organic compounds in bottled waters. Food Chemistry 108 (1), 277–286.
Li, X., Ying, G.G., Su, H.C., Yang, X.B., Wang, L., 2010. Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. Environment International 36 (6), 557–562.
Loos, R., Hanke, G., Umlauf, G., Eisenreich, S.J., 2007. LC–MS–MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters. Chemosphere 66 (4), 690–699.
Loyo-Rosales, J.E., Rosales-Rivera, G.C., Lynch, A.M., Rice, C.P., Torrents, A., 2004. Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (7), 2016–2020.
McNeal, T.P., Biles, J.E., Begley, T.H., Craun, J.C., Hopper, M.L., Sack, C.A., 2000. Determination of suspected endocrine disruptors in foods and food packaging. ACS Symposium Series 747, 33–52.
Monarca, S., De Fusco, R., Biscardi, D., De Feo, V., Pasquini, R., Fatigoni, C., Moretti, M., Zanardini, A., 1994. Studies of migration of potentially genotoxic compounds into water stored in pet bottles. Food and Chemical Toxicology 32 (9), 783–788.
Monteiro, M., Nerín, C., Reyes, F.G.R., 1996. Determination of UV stabilizers in PET bottles by high performance-size exclusion chromatography. Food Additives and Contaminants 13 (5), 575–586.
Montuori, P., Jover, E., Morgantini, M., Bayona, J.M., Triassi, M., 2008. Assessing human exposure to phthalic acid and phthalate esters from mineral water stored in polyethylene terephthalate and glass bottles. Food Additives and Contaminants – Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 25 (4), 511–518.
Muncke, J., 2009. Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: is packaging a relevant source? Science of the Total Environment 407 (16), 4549–4559.
Mutsuga, M., Kawamura, Y., Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., Takatori, K., Tanamoto, K., 2006. Migration of formaldehyde and acetaldehyde into mineral water in polyethylene terephthalate (PET) bottles. Food Additives and Contaminants 23 (2), 212–218.
Mutsuga, M., Tojima, T., Kawamura, Y., Tanamoto, K., 2005. Survey of formaldehyde, acetaldehyde and oligomers in polyethylene terephthalate food-packaging materials. Food Additives and Contaminants 22 (8), 783–789.
Nawrocki, J., Dabrowska, A., Borcz, A., 2002. Investigation of carbonyl compounds in bottled waters from Poland. Water Research 36 (19), 4893–4901.
Newbold, R.R., Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., Haseman, J., 2004. Developmental exposure to diethylstilbestrol (DES) alters uterine response to estrogens in prepubescent mice: low versus high dose effects. Reproductive Toxicology 18 (3), 399–406.
Nijssen, B., Kamperman, T., Jetten, J., 1996. Acetaldehyde in mineral water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: odour threshold and quantification. Packaging Technology and Science 9 (4), 175–185.
Nishioka, K., Hirahara, A., Iwamoto, E., 2002. Determination of antimony in polyethylene terephthalate bottles by graphite furnace atomic absorption spectrometry using microwave sample preparation. Bulletin of the Institute of Life Science, Hiroshima Prefectural Women's University 8, 35–42.
Paci, M., La Mantia, F.P., 1998. Competition between degradation and chain extension during processing of reclaimed poly(ethylene terephthalate). Polymer Degradation and Stability 61 (3), 417–420.
Page, B.D., Lacroix, G.M., 1995. The occurrence of phthalate ester and di-2-ethylhexyl adipate plasticizers in Canadian

Author's personal copy

packaging and food sampled in 1985–1989: a survey. Food Additives and Contaminants 12 (1), 129–151.
Patisaul, H.B., Todd, K.L.A.M.J., Adewale, H.B., 2009. Impact of neonatal exposure to the ERα agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats. Neurotoxicology 30 (3), 350–357.
Peñalver, A., Pocurull, E., Borrull, F., Marcé, R.M., 2000. Determination of phthalate esters in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A 872 (1–2), 191–201.
Pinto, B., Reali, D., 2009. Screening of estrogen-like activity of mineral water stored in PET bottles. International Journal of Hygiene and Environmental Health 212 (2), 228–232.
Reimann, C., Birke, M., Filzmoser, P., 2010. Bottled drinking water: water contamination from bottle materials (glass, hard PET, soft PET), the influence of colour and acidification. Applied Geochemistry 25 (7), 1030–1046.
Romão, W., Franco, M.F., Corilo, Y.E., Eberlin, M.N., Spinacé, M.A.S., De Paoli, M.A., 2009a. Poly (ethylene terephthalate) thermo-mechanical and thermo-oxidative degradation mechanisms. Polymer Degradation and Stability 94, 1849–1859.
Romão, W., Spinacé, M.A.S., De Paoli, M.A., 2009b. Poly(ethylene terephthalate), PET: a review on the synthesis processes, degradation mechanisms and its recycling. Polímeros: Ciência e Tecnologia 19 (2), 121–132 (in Portuguese).
Rule, M., Shi, Y., Huang, X., 2001. Method to Decrease the Acetaldehyde Content of Melt-processed Polyesters United States Patent 6274212. Available: www.patents.com/us-6274212.html (accessed 16.10.11).
Safa, H.L., 1999. Sorption–desorption of aromas on multi-use PET bottles. A test procedure. Packaging Technology and Science 12 (1), 37–44.
Sax, L., 2010. Polyethylene terephthalate may yield endocrine disruptors. Environmental Health Perspectives 118 (4), 445–448.
Schmid, P., Kohler, M., Meierhofer, R., Luzi, S., Wegelin, M., 2008. Does the reuse of PET bottles during solar water disinfection pose a health risk due to the migration of plasticisers and other chemicals into the water? Water Research 42 (20), 5054–5060.
Serôdio, P., Nogueira, J.M.F., 2006. Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water. Water Research 40 (13), 2572–2582.
Shao, B., Han, H., Hu, J., Zhao, J., Wu, G., Xue, Y., Ma, Y., Zhang, S., 2005. Determination of alkylphenol and bisphenol A in beverages using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 530 (2), 245–252.
Sheftel, V.O., 2000. Indirect Food Additives and Polymers: Migration and Toxicology. American Chemical Society, Boca Raton, USA.
Shotyk, W., Krachler, M., 2007. Contamination of bottled waters with antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) increases upon storage. Environmental Science and Technology 41 (5), 1560–1563.
Shotyk, W., Krachler, M., Chen, B., 2006. Contamination of Canadian and European bottled waters with antimony from PET containers. Journal of Environmental Monitoring 8 (2), 288–292.
Skjevrak, I., Brede, C., Steffensen, I.L., Mikalsen, A., Alexander, J., Fjeldal, P., Herikstad, H., 2005. Non-targeted multi-component analytical surveillance of plastic food contact materials: identification of substances not included in EU positive lists and their risk assessment. Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment 22 (10), 1012–1022.
Strube, A., Buettner, A., Groetzinger, C., 2009. Characterization and identification of a plastic-like off-odor in mineral water. Water Science and Technology: Water Supply 9, 299–309.
Sugaya, N., Nakagawa, T., Sakurai, K., Morita, M., Onodera, S., 2001. Analysis of aldehydes in water by head space-GC/MS. Journal of Health Science 47 (1), 21–27.
Tadmor, Z., Gogos, C.G., 2006. Principles of Polymer Processing. Wiley Interscience, Hoboken, New Jersey, USA.
Tombesi, N.B., Freije, H., 2002. Application of solid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry to the determination of butylated hydroxytoluene in bottled drinking water. Journal of Chromatography A 963 (1–2), 179–183.
Tombesi, N.B., Freije, R.H., Augusto, F., 2004. Factorial experimental design optimization of solid phase microextraction (SPME) conditions for analysis of butylated hydroxytoluene (BHT) in bottled water. Journal of the Brazilian Chemical Society 15 (5), 658–663.
Toyo'oka, T., Oshige, Y., 2000. Determination of alkylphenols in mineral water contained in PET bottles by liquid chromatography with coulometric detection. Analytical Sciences 16 (10), 1071–1076.
Wagner, M., Oehlmann, J., 2011. Endocrine disruptors in bottled mineral water: estrogenic activity in the E-Screen. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 127 (1–2), 128–135.
Wagner, M., Oehlmann, J., 2009. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. Environmental Science and Pollution Research 16 (3), 278–286.
Wegelin, M., Canonica, S., Alder, C., Marazuela, D., Suter, M.J.F., Bucheli, T.D., Haefliger, O.P., Zenobi, R., McGuigan, K.G., Kelly, M.T., Ibrahim, P., Larroque, M., 2001. Does sunlight change the material and content of polyethylene terephthalate (pet) bottles? Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA 50 (3), 125–133.
Welle, F., 2011. Twenty years of PET bottle to bottle recycling – an overview. Resources, Conservation and Recycling 55 (11), 865–875.
Welle, F., Franz, R., 2011. Migration of antimony from PET bottles into beverages: determination of the activation energy of diffusion and migration modelling compared with literature data. Food Additives and Contaminants – Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 28 (1), 115–126.
Westerhoff, P., Prapaipong, P., Shock, E., Hillaireau, A., 2008. Antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water. Water Research 42 (3), 551–556.
Yang, C.Z., Yaniger, S.I., Jordan, V.C., Klein, D.J., Bittner, G.D., 2011. Most plastic products release estrogenic chemicals: a potential health problem that can be solved. Environmental Health Perspectives 119 (7), 982–996.
Zhang, H., Ward, I.M., 1995. Kinetics of hydrolytic degradation of poly(ethylene naphtalene-2,6-dicarboxylate). Macromolecules 28 (23), 7622–7629.
Zweifel, H., 2001. In: Handbook of Plastic Additives, 5th ed. Verlag, C.H., Munich (Allemagne).

1.6 LES COMPOSES IDENTIFIES DANS LES EAUX EMBOUTEILLEES EN PET: UN BILAN

A partir de la revue bibliographique des différentes études scientifiques traitant de la migration de substances dans l'eau embouteillée en PET, nous pouvons tirer les conclusions suivantes:

- Pour les mêmes molécules étudiées, les données sont difficilement comparables entre elles et les conclusions sont parfois contradictoires en raison des:
    - Conditions et des facteurs d'influence (temps de contact, température, exposition solaire). Ces paramètres sont propres à chaque étude pour la réalisation des cinétiques migratoires. Certains auteurs fixent les conditions d'exposition en suivant leurs propres critères, alors que d'autres suivent les tests réglementaires préconisés par la législation européenne ou américaine.
    - Marques diverses de bouteilles en PET étudiées, difficulté compliquée par un manque d'information sur la qualité de la matière première, sur les procédés de fabrication de l'emballage et le processus d'embouteillage de l'eau.
    - Caractéristiques chimiques différentes de l'eau embouteillée testée (pH, carbonatation, minéralisation, etc.) et l'utilisation dans certains cas de simulant alimentaire (eau ultrapure) à la place de l'eau de la source.
    - Méthodes d'analyse de l'eau avec des performances analytiques plus ou moins sensibles selon les techniques de préparation et d'analyses de l'échantillon mises en œuvre.
    - Une grande partie de la bibliographie est basée sur des composés identifiés depuis longtemps dans la littérature. Dans le cas du PET, il s'agit de l'acétaldéhyde (produit de dégradation thermique du PET) et l'antimoine (résidu de catalyseur utilisé dans la synthèse du PET). La diffusion de ces deux substances a été largement étudiée et elle est bien connue.

- La présence d'autres composés appartenant aux familles des phtalates, alkylphenols, stabilisants aux UV et lubrifiants a été documentée dans les eaux embouteillées en PET. L'origine de ces substances reste controversée, car elles ne sont pas connues comme entrant dans la fabrication du PET. Les principales origines proposées sont : (i) les bouchons en polyéthylène (PEHD) et polypropylène (i-PP), (ii) une contamination pendant le processus d'embouteillage des bouteilles, (iii) les agents de désinfection des équipements de la chaîne d'embouteillage et (iv) des pollutions pendant la préparation des échantillons pour l'analyse.
- Du point de vue toxicologique, il existe des informations sur la cytotoxicité et la génotoxicité potentielle et individuelle de certains composés identifiés dans des eaux embouteillées (notamment, antimoine et acétaldéhyde). Certaines études ont une approche plus globale et cherchent des réponses toxicologiques à partir de migrats (cocktails des molécules), mais en ne donnant presque jamais la composition chimique précise de ceux-ci (identification et quantification).
- De façon identique aux données de cinétique migratoires, les résultats des essais toxicologiques sont difficilement comparables entre eux et parfois contradictoires, notamment en raison de la grande variété des essais utilisés.

1.7 OBJECTIFS DE LA THESE

Ainsi que précédemment décrit, l'étude des phénomènes de migration dans des eaux embouteillées en PET a généré une littérature scientifique dense au cours de ces dernières années. Malgré ceci, la comparaison des données apportées par ces études s'avère difficile ou même impossible en raison des conditions d'évaluation spécifiques à chaque étude. De plus, les conclusions de certains travaux sont parfois contradictoires. La présence de certaines molécules n'est pas systématiquement confirmée. Les facteurs impactant la migration (conditions extérieures, caractéristiques de l'eau conditionnée, etc.) ne sont pas systématiquement corroborés et ne permettent pas d'expliquer de façon satisfaisante l'occurrence et l'origine de certaines molécules dans l'eau. La diversité des essais toxicologiques employés pour étudier la toxicité potentielle des migrats et le manque d'approches globales permettant de relier la réponse toxicologique d'un migrat à sa composition chimique rend complexe l'évaluation de l'innocuité du matériau polymère.

L'objectif du présent travail de recherche est d'apprécier les phénomènes de migration des constituants (monomères, catalyseurs, impuretés, additifs et néoformés) de l'emballage en PET vers l'eau sous un angle quantitatif, qualitatif et sanitaire:

- En ne se limitant pas à l'étude des migrants conventionnels (acétaldéhyde et antimoine), mais en ayant une approche la plus exhaustive possible,
- En prenant en compte les caractéristiques de l'eau embouteillée,
- En prenant en compte les propriétés physico-chimiques et la structure du polymère qui constitue les bouteilles,
- En prenant en compte les conditions de stockage des bouteilles (temps, température et exposition solaire),
- En étudiant au moyen de divers tests, la réponse toxicologique de migrats pertinents, dont la composition chimique aura été au préalable caractérisée.

L'originalité et la difficulté de cette étude est qu'elle nécessite le recours à trois disciplines différentes : la chimie analytique, la physico-chimie des polymères et la toxicologie alimentaire.

1.8 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La formulation exacte de la composition chimique des matériaux plastiques est propriété de chaque fabricant. Selon Yang *et al.* (2011) un produit en plastique peut être constitué de plus de 100 substances. Chacun de ces composés, ainsi que leurs produits de dégradation, sont susceptibles de diffuser au contact des denrées alimentaires, quand la matière plastique est soumise à un « stress ».

En général, les industriels n'utilisent pas le polymère pur pour la fabrication d'emballage alimentaire. Comme cela a été indiqué dans la section 1.5, l'addition de comonomères et d'additifs tels que les stabilisants et adjuvants technologiques sont employés pour favoriser certaines propriétés physico-chimiques et empêcher le vieillissement du polymère (Pennarun, 2001; Holland et Hay, 2002a).

Durant ces dernières années, le recyclage des plastiques est devenu une pratique courante pour réduire l'empreinte écologique. Cependant, ce procédé peut engendrer des effets indésirables sur le polymère (jaunissement du plastique, diminution du poids moléculaire du polymère, apparition d'odeurs, etc.). Il existe des additifs qui ajoutés au polymère pallient ces effets (Zweifel, 2001). De plus, comme indiqué, le recyclage peut être une source de contamination du matériau par des composés sans rapport avec le PET (Sax, 2010).

Comme cela a déjà été exposé, l'existence des substances présentes involontairement dans le matériau polymère (NIAS) est maintenant bien connue. Ces substances sont des composés néoformés ou des impuretés issues de la dégradation des produits de départ de la polymérisation et/ou des additifs (Franz et Welle, 2008; Severin *et al.*, 2011).

1.8.1 Sélection des migrants potentiels

Ne possédant pas la liste exhaustive des ingrédients utilisés pour la fabrication des bouteilles en PET, la principale problématique rencontrée au début de ce travail de recherche a été de définir les molécules à prendre en compte pour la réalisation des études de migration.

La stratégie mise en œuvre a consisté à établir cette liste de composés organiques et inorganiques en utilisant plusieurs approches :

- ***Une approche bibliographique*** passant par un recensement large des composés détectés dans les eaux embouteillées en PET.
- ***Une approche passant par le vieillissement accéléré d'un panel de bouteilles commerciales dans des conditions extrêmes (UV et température)***, afin de favoriser, d'accélérer et d'intensifier la migration de composés organiques auparavant non cités.

La fusion de ces deux démarches a abouti à l'élaboration d'une liste de migrants potentiels de l'emballage PET vers l'eau, qu'il convenait de suivre lors des tests ultérieurs de migrations.

1.8.2 Les méthodes d'analyse de l'eau.

Pour analyser les molécules recensées précédemment, le recours à des méthodes normalisées ou à des méthodes à développer entièrement a été étudié. Ainsi, pour les éléments inorganiques, l'utilisation de la méthode ISO 17294-2 (ISO, 2003) a été retenue. Cette méthode utilise une détermination par ICP/MS et était déjà pratiquée couramment au laboratoire. Pour les composés carbonylés, l'utilisation de la méthode EPA 554 (USEPA, 1992) a été retenue. Cette méthode par HPLC-DAD permet notamment la détermination du formaldéhyde. Elle a été mise en application au laboratoire dans le cadre de la réalisation de ce travail. Pour les autres composés identifiés lors de l'étape de sélection des migrants potentiels, il a été décidé de ne pas faire appel aux méthodes normalisées spécifiques de chaque famille de composés du fait du nombre d'analyse. Pour réduire le nombre de manipulations, il a donc été décidé de développer une ou plusieurs méthodes multi-résidus. L'ensemble de ces techniques analytiques a été utilisé pour suivre l'évolution des concentrations de ces migrants dans les essais de diffusion.

1.8.3 Les méthodes de caractérisation physico-chimique du matériau PET.

La caractérisation physique et le contrôle de la nature du PET qui constitue les bouteilles commerciales, s'est avéré indispensable pour comprendre l'influence de la structure du polymère sur la diffusion de substances de l'emballage vers l'eau.

Les méthodes de caractérisation physico-chimique du PET qui ont été employées dans ce travail sont les suivantes:

- **La diffraction de rayons X à grands angles (WAXS) et à petits angles (SAXS):** afin de caractériser en détail de la structure et de l'arrangement des chaînes macromoléculaires du polymère dans l'emballage PET.
- **La calorimétrie différentielle à balayage (DSC)**: afin de déterminer la température de transition vitreuse (*Tg*) de la partie amorphe de l'emballage ainsi que le taux de cristallinité (χ_c) dans la partie étirée des bouteilles.
- **La spectroscopie de relaxation mécanique:** afin de caractériser la dynamique des mouvements macromoléculaires des chaînes du PET.
- **L'infrarouge à transformée de Fourier (IRTF):** afin de déterminer la nature chimique et l'état structural du polymère.

1.8.4 Les essais toxicologiques dans l'eau

Plusieurs tests biologiques *in vitro* ont été réalisés afin de mettre en évidence le potentiel toxique des migrats récupérés suite à l'exposition de bouteilles en PET et en verre aux conditions de température et d'exposition solaire les plus sévères.
La génotoxicité et la cytotoxicité induite par nos échantillons d'eaux concentrées ont été recherchées, ainsi que leur caractère perturbateur endocrinien. Plusieurs essais ont été employés:

- ***Essai de cytotoxicité:*** consiste à mesurer la vitesse de synthèse d'ARN totaux sur une lignée de cellules humaines HepG2 (Valentin *et al.*, 2001a). L'utilisation de cette ligne cellulaire originaire d'un hépatome humaine rend plus pertinente l'évaluation du risque chez l'homme. Cet essai a été choisi car il est normalisé sur des cellules HelaS3 par l'agence française de normalisation (AFNOR, 2008) pour l'évaluation des matériaux destinés à entrer en contact avec des eaux potables. De plus, une norme européenne sur les cellules HepG2 est en préparation par le comité européen de normalisation (CEN) suite au projet BIOSAFEPAPER sur l'évaluation des extraits aqueux en contact avec des emballages en papier et carton.

- **Essais de toxicologie génétique:** ces essais permettent de déterminer le caractère génotoxique des mélanges des composés présents dans nos échantillons d'eau.

    - ***Test d'Ames:*** consiste à évaluer le pouvoir mutagène d'une substance. L'essai bactérien de mutation réverse est effectué sur des souches de *Salmonella typhimurium* auxotrophes envers un acide aminé essentiel pour la croissance des bactéries. Ce test fait objet de la ligne directrice de l'OCDE N°471 révisée et adoptée le 21 juillet 1997 (OCDE, 1997). Dans les cas de matières plastiques, c'est un test réglementaire exigé quelles que soient les données de migration.

    - ***Test du micronoyau:*** il est largement utilisé comme test de «screening» pour mettre en évidence un dommage de l'ADN qui ne peut plus être réparé par la cellule et qui représente une mutation établie (Fenech, 2000). Ce test a été sélectionné parce qu'il fait l'objet de la ligne directrice de l'OCDE n°487 depuis le 22 juillet 2010 (OCDE, 2010). Le potentiel génotoxique est mesuré sur une lignée des cellules humaines HepG2 ayant des capacités de métabolisation (Kirkland *et al.*, 2007).

- **Essais du potentiel perturbateur endocrinien:**

    - ***Test de liaison au récepteur aux œstrogènes α (ERα) sur des cellules humaines:*** Cet essai a été choisi parce que les molécules issues des emballages sont des composés préférentiellement œstrogéniques. La lignée cellulaire HepG2 a été utilisée car c'est un modèle connu pour des tests de criblage à court terme, pour son origine tissulaire et pour la compréhension des mécanismes d'action des xénobiotiques (Wilkening *et al.*, 2003; Knasmüller *et al.*, 2004).

    - ***Tests du potentiel perturbateur endocrinien (anti)-androgénique sur le récepteur aux androgènes AR:*** Il s'agit d'un test d'activation transcriptionnelle sur la lignée cellulaire MDA-MB453-kb2, dérivant d'une effusion pleurale issue d'un tumeur mammaire humaine riche en récepteur aux androgènes (AR) (Wilson et al. 2006). Une substance présentant un faible potentiel œstrogénique peut être également anti-androgénique (Sohoni et Sumpter, 1998).

Les principes et le mode opératoire de chaque essai seront présentés de façon détaillée dans le chapitre 5.

1.8.5 Sélection des couples eau / matériau

Cet échantillonnage a été réalisé à partir des bouteilles commercialisées en France. Une première sélection est effectuée sur le même type d'eau conditionnée en emballage PET et en verre.

L'emballage verre s'est avéré nécessaire pour:

- Identifier une pollution éventuelle de la ressource d'eau et/ou du processus d'embouteillage.
- Vérifier, après exposition, que les composés présents dans l'eau provient du PET.

De plus, nous avons sélectionné une eau plate et une eau gazeuse. Des critères visuels comme la couleur, la surface et l'utilisation d'un emballage multicouche ont été aussi pris en compte. Finalement, deux groupes de bouteilles d'eau ont été retenus, référencés dans le présent travail comme A et B. Le tableau 1-3 présente les principales caractéristiques physico-chimiques des bouteilles PET et de l'eau embouteillée employées pour cette étude.

Les bouteilles du groupe A contiennent de l'eau minérale plate conditionnée en PET (A1) et en verre (A2). Dans les bouteilles du groupe B, il s'agit d'une eau minérale gazeuse embouteillée en PET (B1) et en verre (B2).

Les bouteilles A1 sont des bouteilles monocouches PET avec une surface en relief. Les bouteilles B1 sont des emballages multicouches qui possèdent une surface complètement lisse. Les structures multicouches sont constituées d'une fine couche de polymère (dans notre cas du polyamide PA-6) intercalée entre deux couches de PET. Ce type d'emballage est utilisé pour augmenter l'effet barrière du PET (Cros, 2007) et comme barrière fonctionnelle pour éviter le transfert de substances de la couche externe en PET recyclé vers l'aliment (Pennarun, 2001). Dans le chapitre 2 du présent travail, les propriétés barrières du PET et l'utilisation des barrières fonctionnelles sont traitées plus en détail.

Le choix restreint des désignations commerciales est dû au croisement entre le nombre élevé d'analyses et les contraintes de temps. Par contre, ce nombre réduit de désignations permet d'approfondir l'étude des facteurs influençant la migration.

Tableau 1-3: Caractéristiques physico-chimiques de l'eau embouteillée et des bouteilles PET employées pour cette étude

	Groupe A		**Groupe B**	
Conditionnement	**PET (A1)**	**Verre (A2)**	**PET (B1)**	**Verre (B2)**
Date d'embouteillage	04/2010	04/2010	02/2010	-
Type de bouteille	Monocouche	-	Multicouche PET-PA-PET	-
Volume	1,5 L	1 L	1 L	0,75 L
Couleur	Bleu claire	Transparente	Verte	Verte
Caractéristiques de l'eau (*)				
Type d'eau	Eau minérale plate		Eau minérale gazeuse	
pH *(unité pH)*	7,2		5,2	
Alcalinité Totale *(mL N/10)*	61 ,4		69,4	
Carbone Organique Totale *(mg C/L)*	< 1		< 1	
CO_2 libre *(mg /L)*	-		6530	
Conductivité à 25°C *(µS/cm)*	574		758	
Résidu sec à 180°C *(mg/L)*	330		489	
Silice *(mg SiO_2/L)*	16,3		10,7	
Bromure *(mg/L)*	< 1		< 1	
Chlorures *(mg/L)*	7,5		24,7	
Fluorures *(mg/L)*	< 0,1		0,13	
Hydrogénocarbonates *(mg/L)*	374,54		423,34	
Nitrates *(mg/L)*	3,2		5,6	
Nitrites *(mg/L)*	< 0,04		< 0,04	
Orthophosphates *(mg/L)*	< 0,1		< 0,1	
Sulfates *(mg/L)*	12		38,6	

(*) Enquête Nationale AFSSA 2008-2009.

1.8.6 Cinétiques de migration du PET vers l'eau

La synthèse bibliographique a mis en évidence l'existence de trois facteurs externes qui peuvent influencer la diffusion des composés de l'emballage PET vers l'eau:

- le temps de contact,
- la température,
- l'exposition solaire.

Compte tenu de ces paramètres, nous avons adopté deux approches qui ont permis d'évaluer :

- L'effet du temps de contact avec l'exposition solaire à température ordinaire.
- L'effet du temps de contact avec la température.

Les conditions expérimentales pour chaque facteur d'exposition et les résultats expérimentaux sont présentés dans le chapitre 4 du présent travail. Le croisement entre les facteurs externes et des facteurs internes comme la typologie de l'eau et du matériau polymère a été réalisé.

Chapitre 2: LE MATERIAU PET POUR LE CONDITIONNEMENT DE L'EAU

Dans le chapitre 1 du présent travail, les facteurs d'influence sur la migration des composés du matériau polymère vers l'aliment ont été décrits. Comme indiqué, la nature, l'état structural, la morphologie et la cristallinité du matériau polymère qui constitue l'emballage sont des paramètres qui ont un impact sur la diffusivité des molécules. De plus, certains migrants potentiels sont générés par décomposition ou dégradation du polymère pendant sa synthèse, sa mise en forme et son usage.

La caractérisation physique et physico-chimique des bouteilles en PET destinées au conditionnement de l'eau s'avère nécessaire afin de comprendre plus clairement les phénomènes de migration des constituants du matériau polymère vers l'eau embouteillée.

Dans la première partie de ce chapitre, nous allons présenter les principaux mécanismes de synthèse du PET avec sa morphologie et structure semi-cristalline. Ensuite, on abordera le vieillissement physique et chimique du PET qui provoque des changements dans la structure et la composition du matériau polymère.

L'état des connaissances sur la mise en forme des bouteilles en PET destinées à l'emballage de l'eau et leurs propriétés barrières seront ainsi traités. Cette partie sera conclue en présentant brièvement du recyclage de ce matériau polymère. Comme indiqué dans le chapitre 1, certains auteurs signalent le recyclage comme source de composés étrangers dans l'emballage polymérique qui sont des éventuels migrants.

La deuxième partie du chapitre est dédiée à l'étude du PET des bouteilles des marques A et B sélectionnées pour la réalisation de ce travail de recherche. Les techniques de caractérisation ainsi que les résultats seront exposés afin de mieux comprendre les mécanismes de migration des constituants des bouteilles en PET vers l'eau.

2.1 LA SYNTHESE DU PET

Plusieurs réactions peuvent être utilisées pour la synthèse du PET (AFSSA, 2006):

a) La réaction d'estérification directe de l'éthylène glycol par l'acide téréphtalique.

b) La réaction de polytransestérification du téréphtalate de diméthyle par l'éthylène glycol.

c) La réaction de l'acide téréphtalique avec l'oxyde d'éthylène.

Les procédés a) et b) sont les plus utilisés dans l'industrie (Pennarun, 2001; Naït-Ali, 2008). Le schéma réactionnel suivant montre les étapes de synthèse du PET au moyen de ces deux procédés:

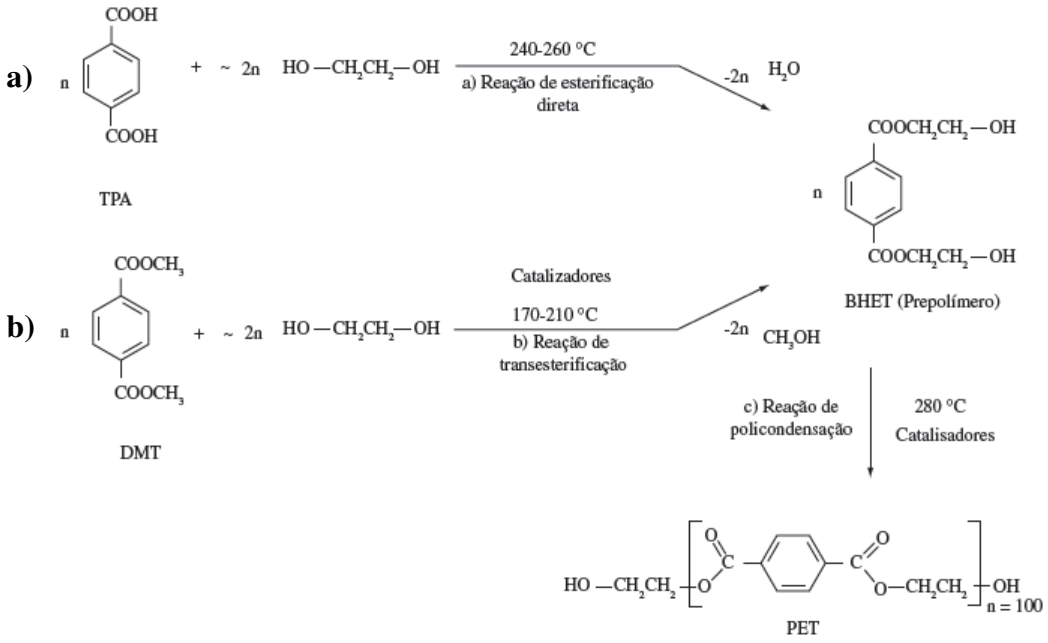


Figure 2-1: Méthodes de synthèse du PET (Romão et al., 2009b)

Dans les deux cas, la première étape consiste en la formation du monomère bis (2-hydroxyéthyl) téréphtalate (BHET). Dans la réaction a) l'eau est générée comme sous-produit de réaction ce qui est un avantage par rapport au procédé b) où l'excès d'éthylène glycol génère du méthanol, et ce qui implique que la quantité de méthanol en excès doit être éliminée par distillation. Ensuite, la deuxième étape consiste en une polycondensation du produit intermédiaire BHET produisant un excès d'éthylène glycol qui est éliminé sous vide.

La réaction est accélérée par l'addition de catalyseurs organométalliques. Les catalyseurs à base d'antimoine (généralement des acétates et des oxydes) sont utilisés dans 90% de la production mondiale du PET (Westerhoff *et al.*, 2008), notamment le trioxyde d'antimoine (Sb_2O_3) à cause de son prix peu élevé par rapport à l'acétate et le glycoxide d'antimoine D'autres catalyseurs de polycondensation à base de germanium, titane, aluminium et des zéolites existent mais sont beaucoup moins employés à cause de leur prix ou par le fait qu'ils génèrent du PET de moins bonne qualité (ILSI, 2000; El-Toufaili, 2006).

Les deux réactions de synthèse a) et b) génèrent un PET de qualité équivalente mais plus de 70% de la production globale de PET est basée sur la polycondensation de l'éthylène glycol par l'acide téréphtalique (réaction b).

Le PET utilisé pour la fabrication des fibres ou des films présente une masse molaire de l'ordre de 20 000 g/mol. Une viscosité plus élevée est nécessaire pour le PET destiné à la fabrication des bouteilles. Dans ce cas, la masse moléculaire est aux alentours de 25 000 g/mol (Etienne et David, 2002).

Durant la synthèse du PET des comonomères tels que l'éthylène glycol, le diéthylène glycol, l'acide isophtalique, 1,3-propanodiol, 1,4-butanodiol, l'acide dicarboxylique naphtalène et cyclohexanedimethanol sont ajoutés pour donner certaines propriétés aux bouteilles en PET, notamment celles employées pour le conditionnement des eaux gazeuses. Holland et Hay (2002a) ont mis en évidence la présence des mélanges de copolymères dans le PET commerciaux avec entre 1,3 – 2,6 mol % d'acide isophtalique et entre 2 - 4 mol % de diéthylène glycol. Le rôle des ces substances est de limiter la cristallisation thermique du polymère et d'apporter de la flexibilité durant la fabrication de la préforme et le soufflage des bouteilles. Ces substances améliorent les propriétés mécaniques, les propriétés barrières et l'imperméabilité aux gaz du polymère (Holland et Hay, 2002a; Romão *et al.*, 2009b). En réduisant les taux de cristallinité des bouteilles on obtient un récipient transparent, qui donne une impression de pureté (caractéristique souhaitable dans le cas de bouteilles d'eau) et permet ainsi d'avoir des bouteilles plus légères (ILSI, 2000). Le comonomère le plus utilisé pour la production du PET destiné au conditionnement de l'eau est le diéthylène glycol (Romão *et al.*, 2009b).

2.2 MORPHOLOGIE ET STRUCTURE SEMI-CRISTALLINE DU PET

Il existe plusieurs modes de cristallisation des polymères semi-cristallins. Parmi eux, nous allons brièvement présenter la cristallisation par refroidissement depuis l'état fondu. Puis, on abordera la cristallisation par étirage mécanique (déformation). Chaque mode de cristallisation induit une microstructure du polymère particulière.

Le processus de cristallisation d'un polymère à partir de l'état liquide peut être décrit en trois étapes: la germination qui conduit à la formation des germes, le développement des cristallites à partir de la croissance de ces germes et l'assemblage des lamelles de cristallites pour former des superstructures sphérolitiques qui rendent le polymère opaque**.**

Les polymères cristallisables, comme le PET ont une partie des chaînes macromoléculaires dans un état amorphe et son rôle est d'assurer la liaison avec les cristallites. En effet, une cristallisation totale suppose un réarrangement trop important des chaînes macromoléculaires qui participent au développement des cristaux. Dans le cas de bouteilles en PET, la cristallisation est induite par déformation. Ce mode de cristallisation empêche la formation des sphérolites et génère une microstructure constitués de cristallites de tailles très inférieures aux longueurs d'onde du rayonnement visible, ce qui rend le polymère transparent (Stockfleth *et al.*, 1993; Vigny *et al.*, 1997; Etienne et David, 2002). Les aspects principaux du procédé de mise en forme des bouteilles en PET par injection-soufflage de la préforme seront traités dans la section 2.4.

La structure de la phase cristalline du PET a été déterminée par Daubeny et Bunn (1954) au moyen de la diffraction des rayons X. Leurs travaux ont mis en évidence que:

- **L'arrangement moléculaire du PET présente une configuration planaire.**
  Le cycle aromatique est situé dans le plan défini par le «*zig-zag*» planaire du squelette de la chaîne.

- **Les interactions intermoléculaires (distance entre les atomes des molécules voisines) sont uniquement de liaisons faibles de type van der Waals.**
  Ces liaisons faibles permettent des changements de conformation *gauche/trans* des unités glycolytiques que constituent la chaîne polymérique au sein de la phase amorphe (cf. figure 2-2).

Dans les cas des bouteilles en PET, la conformation *trans* est favorisée par la cristallisation induite par l'étirage mécanique de la phase amorphe alors que la conformation *gauche* est caractéristique de l'état amorphe (Atkinson *et al.*, 2000; Duchesne *et al.*, 2002; Naït-Ali, 2008).

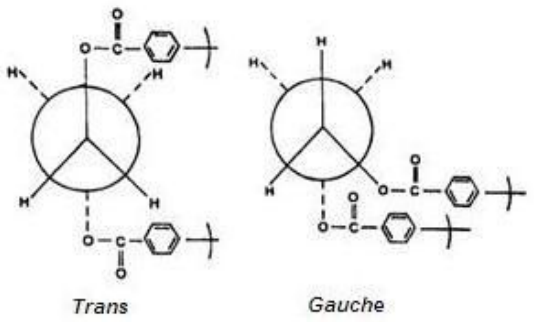


Figure 2-2: Conformation *trans* et *gauche* du PET (Fechine *et al.*, 2002)

- **La structure cristalline du PET peut être définie par un arrangement triclinique comme montre la figure 2-3**. Les paramètres de maille calculés par les auteurs sont les suivants: a = 4,56 Å, b = 5,94 Å, c = 10,75 Å, α = 98,5, β = 118, γ = 112.

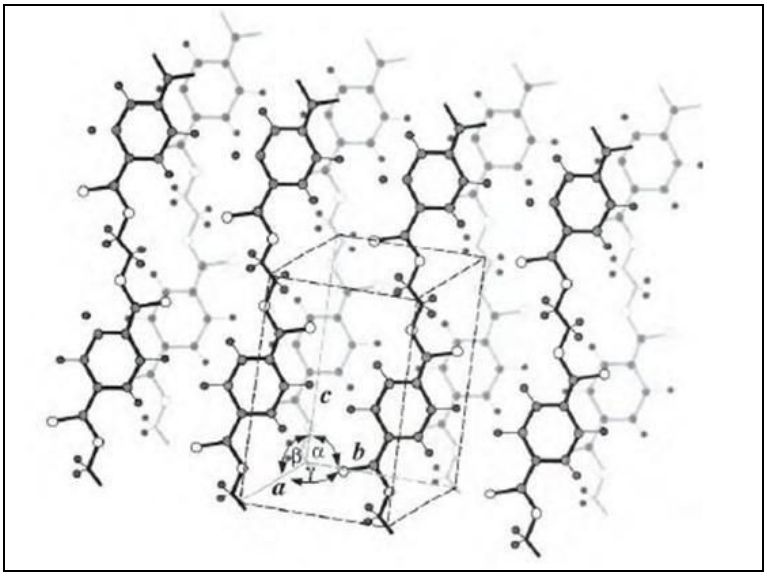


Figure 2-3: Arrangement triclinique du PET (Daubeny et Bunn, 1954; Picard, 2008)

Contrairement à ces paramètres de maille cristalline, la morphologie semi-cristalline peut varier en fonction de l'histoire thermique du polymère et de la déformation permanente induite par le procédé de mise en forme du PET.

Dans notre étude, la caractérisation de la morphologie semi-cristalline, l'arrangement et taille des cristaux dans les bouteilles en PET, s'avère nécessaire pour comprendre les phénomènes de vieillissement chimique et physique du matériau exposé à certaines conditions environnementales. En effet ces phénomènes de vieillissement induisent et/ou accélèrent la migration des molécules du PET vers l'eau.

2.3 VIEILLISSEMENT DU PET

Fayolle et Verdu (2005) ont défini le vieillissement comme une modification de la structure et/ou la composition du matériau polymère causée par sa propre instabilité, par l'interaction avec l'environnement, par une contrainte mécanique ou bien par combinaison de plusieurs de ces causes. En fait, on distingue deux processus de vieillissement:

- Le vieillissement chimique qui entraîne des modifications de la structure macromoléculaire et les propriétés mécaniques du polymère.
- Le vieillissement physique qui modifie la configuration spatiale du réseau macromoléculaire ou la composition du matériau polymère.

Les aspects spécifiques de ces deux vieillissements dans les cas du PET feront l'objet des sections suivantes.

2.3.1 Vieillissement chimique du PET

Plusieurs réactions de dégradation peuvent avoir lieu pendant la synthèse, le processus de fabrication des bouteilles et le recyclage du PET. La présence ou l'absence des ces phénomènes de vieillissement est directement liée au type et à la quantité de comonomères et catalyseurs employés durant la synthèse du PET (Pennarun, 2001; Romão *et al.*, 2009a).

La plupart de ces dégradations se produisent sous l'effet de la température, quand on porte le PET à l'état fondu. Mais la présence d'oxygène et d'eau pendant l'extrusion des granulés peut aussi être à l'origine d'un vieillissement chimique du matériau polymère.

Ces dégradations provoquent la scission de chaînes macromoléculaires et génèrent des sous-produits de réaction. D'une part, les fins de chaînes issues de la rupture et réarrangement de celles-ci ont des effets sur les propriétés mécaniques et barrières du polymère. Nous rappelons que la rupture les chaînes macromoléculaires peut générer des composés (acétaldéhyde, formaldéhyde, etc.) susceptibles de migrer du PET vers l'eau. Ces composés ont été listés dans le chapitre 1.

Essentiellement, le PET peut souffrir de trois types de vieillissement chimique: la décomposition thermique, la thermo-oxydation, le vieillissement photochimique et l'hydrolyse.

2.3.1.1 La décomposition thermique du PET

La décomposition thermique anaérobie du PET est un phénomène qui a été largement étudié (McNeill et Bounekhel, 1991; Villain *et al.*, 1995; Holland et Hay, 2002b; Romão *et al.*, 2009a). Cette dégradation peut se produire pendant la polycondensation et durant l'injection de la matière fondue pour élaborer les préformes en travaillant à températures supérieures à la température de fusion du PET, qui est environ 245°C à 265°C (Lorusso *et al.*, 1985) ainsi que l'illustrent nos résultats d'analyse calorimétriques (cf. section 2.7.3).

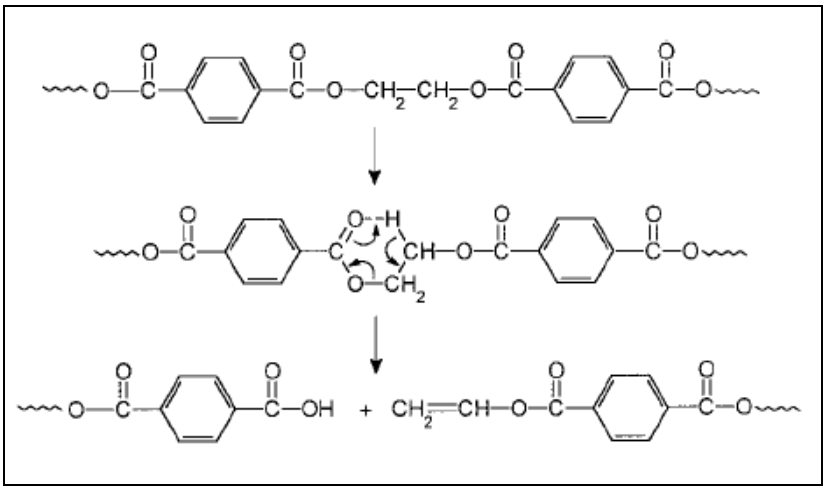


Figure 2-4: Réaction de décomposition thermique du PET (Dzięciol et Trzeszczyński, 1998)

La scission des chaînes du polymère génère des fins de chaînes vinyliques et carboxyliques qui peuvent se recombiner au moyen d'une réaction de transesterification (Dzięciol et Trzeszczyński, 1998; El-Toufaili, 2006; Romão *et al.*, 2009b).

2.3.1.2 L'oxydation du PET

Le schéma général pour décrire les mécanismes d'oxydation d'un polymère est le suivant :

– amorçage :	polymère ou impureté $\rightarrow P^{\bullet}$ (radicaux)	(I)
– propagation :	$P^{\bullet} + O_2 \rightarrow PO_2^{\bullet}$	(II)
	$PO_2^{\bullet} + PH \rightarrow PO_2H + P^{\bullet}$	(III)
– terminaison :	$PO_2^{\bullet} + PO_2^{\bullet} \rightarrow$ produits inactifs	(IV)

Figure 2-5: Schéma général des mécanismes de dégradation par oxydation (Verdu, 1990)

Selon Verdu (2002), ce processus comprend les étapes suivantes :

(I) Formation des radicaux libres (P°).

(II) Transformation des radicaux primaires en radicaux peroxyle (PO_2°) en présence d'oxygène.

(III) Arrangement d'un atome d'hydrogène sur le polymère pour former de groupements hydroperoxydes (PO_2H), thermiquement instables.

(IV) L'étape de terminaison avec le réarrangement de POOP° pour former de produits inactifs tels que des peroxydes (POOP) et de l'oxygène.

L'étape d'amorçage (I) peut être activée:

- Thermiquement par rupture des liaisons les plus faibles du polymère et on parle d'une dégradation thermo-oxydative.

- Photochimiquement par exposition à l'UV solaire et on parle de photo-dégradation.

- Radiochimiquement par interaction du polymère aux radiations ionisantes (rayons X, γ, α, β, etc.).

- Chimiquement par contact avec des réactifs oxydants (permangate de potassium, bichromate de potassium, etc.).

Dans le cadre de notre étude, les bouteilles en PET, les deux mécanismes d'oxydation qui nous concernent sont la thermo-oxydation et la photo-oxydation de ces polymères. Ces deux phénomènes de vieillissement chimique sont présentés dans les sections suivantes.

a) La thermo-oxydation du PET

La cause principale de cette dégradation est le contact du polymère avec l'oxygène combiné à la température. Dans le cas des polymères semi-cristallins, l'oxydation thermique ne concerne que les zones amorphes et peut se produire dans toutes les étapes du cycle de vie d'un polymère (Verdu, 2002).

Le mécanisme de thermo-oxydation du PET ont été décrits comme un processus généré au niveau des méthylènes de la chaîne du polymère des groupements hydroperoxydes (c.f. fig. 2-5). Puis, une rupture homolytique de la chaîne peut se produire entraînant une détérioration irréversible du matériau polymère (Kovarskaya *et al.*, 1968; Naït-Ali, 2008). Les changements de distribution du poids moléculaire et des endommagements au niveau de la surface du matériau polymère sont les principaux changements générés par cette décomposition. Ces détériorations ont un impact direct sur les propriétés mécaniques du matériau polymère (résistance à la traction et élongation). Par conséquent les possibilités de mise en forme du polymère sont réduites (Paci et La Mantia, 1998; Zweifel, 2001; Strandberg et Albertsson, 2008).

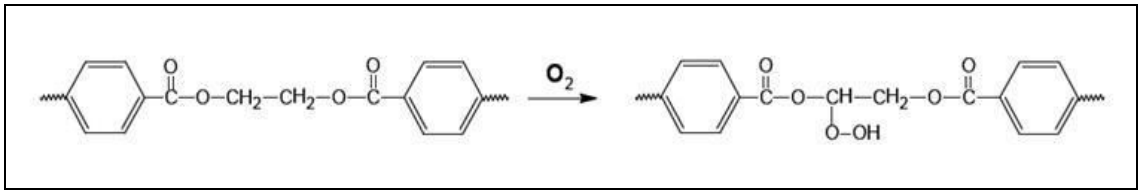


Figure 2-6: Dégradation thermo-oxydative du PET (Naït-Ali, 2008)

De plus, la thermo-oxydation peut produire de substances chromophores qui donnent une couleur jaunâtre au PET. Cette couleur n'est pas souhaitable pour les emballages destinés aux boissons surtout au niveau du conditionnement de l'eau car la transparence donne une sensation de pureté. L'étude des variations de la couleur du PET et l'identification des substances responsables de ce phénomène ont été traitées par plusieurs auteurs (Edge *et al.*, 1995; Edge *et al.*, 1996; Ciolacu *et al.*, 2006; Romão *et al.*, 2009b).

La stabilité du PET vis-à-vis de l'oxydation est dépendante du taux de diéthylène glycol utilisé durant la synthèse et du catalyseur utilisé pour la transestérification du PET (Dzięciol et Trzeszczyński, 1998). En effet, Yang *et al.* (2010) ont mis en évidence que les catalyseurs à base de titane (utilisé pendant la polycondensation du PET) augmentent considérablement la thermo-oxydation, par rapport aux catalyseurs à base d'antimoine. Par contre ces derniers donnent une coloration jaune au PET.

b) La photo-dégradation du PET

Un polymère exposé à la lumière solaire et à l'air, peut être sujet au vieillissement photochimique. En effet, c'est le cas pour le PET qui absorbe dans une longueur d'onde (λ) située à l'extrême limite de l'UV solaire (300 nm $\leq \lambda \leq$ 330 nm). Cette dégradation est un phénomène superficiel, l'épaisseur de la couche dégradée est fonction décroissante de l'absorptivité du matériau et peut être limitée par la diffusion de l'O_2 (Verdu, 2002).
Fechine *et al.* (2002) ont étudié les changements sur la morphologie et cristallinité sur des films en PET à cause de la photo-dégradation. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) a mis en évidence des pertes d'orientation biaxiale des films.

2.3.1.3 L'hydrolyse du PET

L'hydrolyse du PET consiste en la scission des liaisons esters de la chaîne du polymère en présence des molécules d'eau. Chaque coupure de chaîne entraîne la formation des groupements terminaux d'acides carboxyliques et hydroxyles (Campanelli *et al.*, 1993).

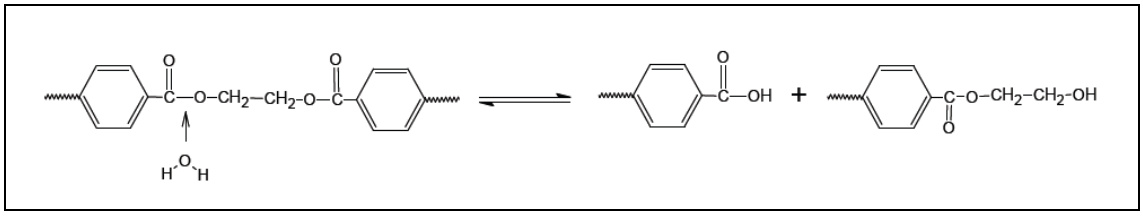


Figure 2-7: Dégradation par hydrolyse du PET (Naït-Ali, 2008)

Cette réaction s'avère être très rapide quand le polymère est dans son état fondu, donc pendant le processus de fabrication de la préforme. Afin d'éviter les coupures des chaînes par hydrolyse, il est important de réaliser un séchage adéquat du polymère avant de l'emmener à son état fondu.
Quand le PET se trouve à l'état solide, la décomposition par hydrolyse est dépendante de la perméabilité et des mouvements macromoléculaires des chaînes. L'étape initiale de la décomposition se produit dans les zones amorphes du polymère. La partie cristalline du PET reste insensible à l'hydrolyse jusqu'à un état très avancée de dégradation (Allen *et al.*, 1991; Paci et La Mantia, 1998; Kint et Muñoz-Guerra, 1999; Launay *et al.*, 1999). Ce type de vieillissement est généralement très lent à températures très inférieures à la température de fusion du PET (entre 245°C et 265°C), du fait de la faible vitesse de la réaction et de l'adsorption lente de l'eau au sein de la matrice du polymère (Carta *et al.*, 2003).

D'après Zhang et Ward (1995), la réaction d'hydrolyse du PET est auto-catalysée par les groupements terminaux d'acides carboxyliques. Contrairement, d'autres études (Launay *et al.*, 1994,1999) affirment que le caractère auto-accéléré de la décomposition par hydrolyse peut s'expliquer par une cinétique de deuxième ordre classique. Dans tous les cas, ce type de dégradation induit une réduction du poids moléculaire et une augmentation de la cristallinité du polymère.

2.3.2 Vieillissement physique

On distingue deux mécanismes de vieillissement physique (Fayolle et Verdu, 2005):

2.3.2.1 La relaxation structurale

Ce type de vieillissement entraîne une modification dans l'arrangement spatial des unités constituant les chaînes macromoléculaires. La cinétique de ce phénomène est gouvernée par des paramètres thermodynamiques (température T, contrainte au seuil σ). Le vieillissement physique d'un polymère amorphe est un phénomène bien étudié et a fait l'objet de nombreuses publications. Un maintien prolongé à une température inférieure et proche de Tg (vieillissement «direct») conduit à une augmentation de la compacité des unités structurales, donc à une diminution de leur mobilité (Etienne *et al.*, 2007). Du point de vue pratique, les principales conséquences de ce phénomène sont:

- une augmentation du module de relaxation dynamique,
- une augmentation de la contrainte au seuil, ce qui implique une fragilisation du matériau.

Dans le cas des polymères semi-cristallins obtenus par cristallisation thermique, le phénomène est plus complexe, car il concerne la phase amorphe et éventuellement la phase cristalline.

Le cas des polymères cristallisés par étirage mécanique (ce qui est le cas qui nous intéresse) est encore plus complexe, d'une part à cause de la nature des cristallites formés (il ne s'agit pas de lamelles mais essentiellement d'un assemblage anisotrope des chaînes «étirées») et de la nature étirée et orientée de la phase amorphe.

Durant la mise en forme d'un matériau polymère, la cristallisation et l'orientation diminuent la mobilité moléculaire des chaînes polymériques et lorsque le matériau est refroidi, sa structure moléculaire reste figée dans un état métastable. En effet, le polymère est dans état hors équilibre thermodynamique. Par conséquent dans le produit fini, à la température d'utilisation, il existe une certaine mobilité résiduelle qui permet des changements très lents de l'arrangement spatial du réseau macromoléculaire vers l'équilibre (Fayolle et Verdu, 2005).

Entre les possibles variantes existantes de ces phénomènes de relaxation structurale, nous avons sélectionné ceux qui peuvent affecter les polymères semi-cristallins. Plus concrètement, les bouteilles en PET (cristallisées et orientées par déformation mécanique) qui peuvent subir une relaxation d'orientation et une «post-cristallisation».

Dans la relaxation d'orientation, le réseau moléculaire se désoriente de façon spontanée afin d'atteindre l'équilibre thermodynamique donc la stabilité. Ce phénomène se produit à températures supérieures à la température de transition vitreuse du polymère (*Tg*) seulement dans la phase amorphe du polymère semi-cristallin.

Dans la «post-cristallisation», le polymère semi-cristallin tente d'arriver à une cristallisation complète. Ce phénomène se produit dans des températures situées entre *Tg* et la température de fusion (*Tf*) du polymère.

Figure 2-8: Evolution de la morphologie du PET: préforme amorphe, bouteille élaborée par soufflage/étirage la même bouteille après un maintien à 110°C pendant 1 heure

L'ensemble des transformations structurales comme conséquence de traitements thermomécaniques est illustré sur la figure 2-8. La préforme obtenue par injection à l'état liquide, suivie d'un refroidissement rapide, est amorphe et sensiblement isotrope. La partie étirée de la bouteille est partiellement cristallisée (transparente sans sphérolites) tandis que le goulot et le pied de la bouteille sont restés amorphes. Après traitement thermique (1 heure à 110°C) de la bouteille on constate que:

a) le goulot et le fond cristallisés thermiquement sont devenus opaques (présence de sphérolites),

b) le PET constituant le corps de la bouteille, reste transparent et partiellement cristallisé mais il s'est rétracté.

Ce qui signifie que la phase amorphe du PET partiellement cristallisé par étirage a perdu son orientation après maintien à température supérieure à *Tg* d'environ 40°C pendant 1 heure.

2.3.2.2 L'absorption - désorption

Comme nous l'avons évoqué précédemment, ce type de vieillissement physique se produit quand le matériau polymère absorbe des substances en provenance de son environnement extérieur (solvant ou eau) ou bien quand les adjuvants qu'il contient ont tendance à migrer dans l'environnement. Les phénomènes d'absorption impliquent une perte importante des propriétés mécaniques du matériau et les phénomènes de migration des adjuvants entrainent la perte des propriétés apportées pour ces molécules dans le polymère.

2.4 LA MISE EN FORME DE LA BOUTEILLE EN PET

La fabrication des bouteilles en PET consiste en l'extrusion des granulés suivie du moulage de la matière fondue pour obtenir la préforme et le soufflage de celle-ci. Ces procédés peuvent être réalisés simultanément ou bien séparément. Les granulés sont fondus et puis injectés dans un moule afin d'obtenir une préforme qui est pratiquement amorphe (cf. figure 2-8 et 2-9). La température d'injection de la matière fondue varie entre 270 et 290°C selon les procédés (Pennarun, 2001; Konkol, 2004).

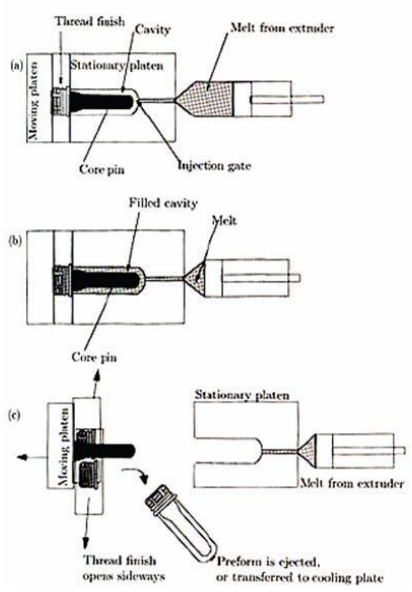


Figure 2-9: Processus de fabrication des préformes (Marechal. E, 2002)

Le moule est refroidi par circulation interne d'eau à une température entre 10°C et 20°C afin de figer le PET dans un état amorphe. De cette façon, le polymère se trouve dans un état hors équilibre et les sollicitations mécaniques favorisent le processus de cristallisation. Ensuite, la préforme est chauffée par IR jusqu'à environ 100°C. A partir de la préforme restée amorphe, le soufflage de la bouteille est effectué par bi-étirage radial et axial sous pression (30 < P < 40 bars) à des températures comprises entre 100°C et 125°C (chauffage IR) (cf. figure 2-10) (Chevalier *et al.*, 2001).

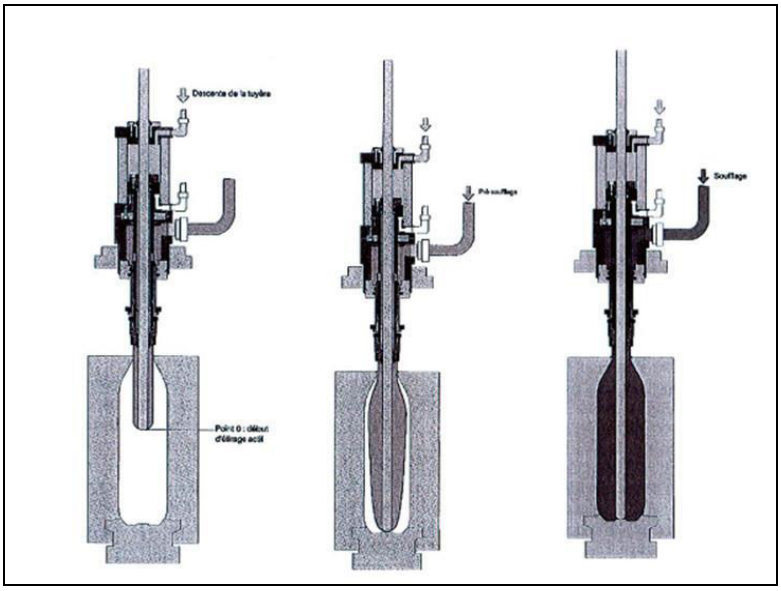


Figure 2-10: Mise en forme des bouteilles en PET (Chevalier *et al.*, 2001)

Les conditions de mise en œuvre des bouteilles sont étroitement liées à la microstructure du PET (cristallisation et orientation) induite par l'étirage mécanique. Un réglage optimal de mise en forme est la clé pour que la bouteille atteigne des bonnes propriétés barrières (imperméabilité aux gaz), optiques (transparence) et mécaniques (rigidité, résistance au choc, à l'écrasement, etc.) adéquates pour son application (Chevalier *et al.*, 2001; Marco *et al.*, 2004).

2.4.1 Les propriétés mécaniques des bouteilles

Les propriétés physiques du PET amorphe isotrope et de la phase cristalline ont été très étudiées et sont bien connues. Certaines de ces propriétés sont rapportées dans le tableau 2-1.

Tableau 2-1: Propriétés physiques du PET amorphe isotrope et de la phase cristalline (Etienne et David, 2002)

Propriétés	PET amorphe	PET cristallin
Masse volumique (kg/m^3)	1335	1452[a]
Module de Young (MPa)	2000 (T = 300 K)[b] 3060 (T = 300 K)[c]	76 000 (direction // chaînes) Environ 2000 (direction transverse)
Module de cisaillement (MPa)	800 (T = 300 K)[b] 1080 (T = 300 K)[c]	-

(a)calculé d'après les paramètres de maille cristalline, (b) mesuré à Hz., (c)mesuré par ultrason à 5 MHz, (d) mesuré par RX.

En dehors des ces cas simples, les propriétés du PET semi-cristallin sont plus difficiles à définir car elles sont fonction du taux de cristallinité. De manière générale, un polymère semi-cristallin présente une fragilité supérieure par rapport au même polymère amorphe à cause des caractéristiques physiques et organisationnelles de la phase cristalline (Naït-Ali, 2008). C'est naturellement le cas du PET. Quelques propriétés mécaniques d'un PET amorphe et PET semi-cristallin sont listées dans le tableau 2-2.

Tableau 2-2: Quelques propriétés du PET amorphe et du PET semi-cristallin (Nait-Ali 2008)

Propriétés	PET amorphe	PET semi-cristallin
PHYSIQUES		
Absorption d'eau (24H, en %)	0,16	0,1
MECANIQUES		
Contrainte seuil (MPa)	56	75
Allongement au seuil (%)	5	2,5
Module d'Young (MPa)	2000 – 2200	2600 - 2800
Allongement à la rupture (%)	200 - 300	70 - 100
THERMIQUES		
Température de fusion (°C)	-	255
Transition vitreuse (°C)	67	81

Cependant comme indiqué par Marco *et al.* (2004), les propriétés mécaniques du PET dépendant de la texture microstructurale (orientation et extension des chaînes) et du taux de cristallinité du produit fini. Ces caractéristiques peuvent être modifiées pendant la mise en en forme des bouteilles.

2.4.2 Les propriétés barrières des bouteilles

Dans l'industrie alimentaire, les polymères utilisés comme emballage doivent protéger l'aliment contre les pollutions extérieures, les microorganismes, la lumière, l'humidité, la diffusion d'oxygène et du dioxyde de carbone (Feigenbaum *et al.*, 1993).

La perméation *P* d'une molécule est fonction du coefficient de diffusion *D* et du facteur de solubilité *S* de cette molécule dans le polymère.

$$P = D \times S$$

Les coefficients *D* et *S* sont thermiquement activés et dépendent de l'état structural du polymère. Nous rappelons que la perméabilité au gaz du PET (en particulier, O_2 et CO_2) est directement dépendante de la cristallisation induite par étirage et de l'orientation de la phase amorphe résultant du soufflage des bouteilles. Plus le polymère est cristallin et/ou orienté, plus son imperméabilité augmente puisque la disposition des macromolécules laisse que peu d'espace aux molécules de gaz pour pénétrer ou traverser le matériau polymère et leur mobilité est réduite (Naït-Ali, 2008).

Tableau 2-3: Coefficient de perméation du PET à 30°C (10^{14} P cm^2 s^{-1} Pa^{-1}) (Elias, 1993)

	O_2	CO_2
PET « normal »	4	20
PET biétiré	0,2	1

On distingue plusieurs voies pour améliorer les propriétés barrières du PET:

- La sélection d'une température optimale pour le soufflage des bouteilles est essentielle pour attiendre des bonnes propriétés barrières. En effet, Liu *et al.* (2004b) ont mis en évidence qu'une température trop élevée lors du soufflage des bouteilles entraîne une perte de densité de la phase amorphe ce qui implique une augmentation de la perméabilité au gaz (O_2 et CO_2).

- La copolymérisation est une autre possibilité pour améliorer l'effet barrière. Dans le chapitre 1 les principaux comonomères utilisés pour le PET destiné à l'emballage de l'eau ont été détaillés.
- Une autre alternative est la fabrication des bouteilles multicouche. La perméabilité s'avère renforcée par une fine couche de polymère intercalée entre deux couches de PET. Les polyamides (PA), le copolymère d'alcool vinyl éthylène (EVOH), des polymères qui absorbent l'oxygène et des nanocomposites sont fréquentement utilisés pour ces structures de type «*sandwich*». Il est aussi possible de déposer dans la couche extérieure des préformes des composés organiques (époxy-amines) et inorganiques (généralement composés à base de carbone ou silice) applicables par spray ou bien par trempage avant le soufflage de la bouteille pour réduire la perméabilité aux gaz des bouteilles en PET (Cros, 2007).

2.5 LE RECYCLAGE DES BOUTEILLES EN PET

Durant ces dernières 20 années, le recyclage des matières plastiques est devenu une procédure courante afin de réduire le volume de déchets et préserver les ressources naturelles. La valorisation des déchets et leur recyclage ont été activement encouragés lors de l'apparition de la directive 94/62/CE du 20 décembre 2004 relatives aux emballages et aux déchets d'emballages.

En 2009, le taux de recyclage des emballages ménagers en France a été de 63%, dont 22% pour les matières plastiques usagées (PET, PEHD, PP, PVC, etc.). En termes de quantité, les emballages en PET sont les plus nombreux, notamment les bouteilles en PET. Nous rappelons que le PET est le polymère le plus utilisé pour la fabrication des bouteilles destinées au conditionnement des boissons (eau, jus de fruits, bière, vin, etc.).

Plusieurs procédés de recyclage du PET ont été mis au point par l'industrie. Dans un premier temps, le PET recyclé était destiné uniquement à l'industrie, notamment au secteur textile pour la fabrication des fibres. Bien que le PET se caractérise par sa capacité d'absorption faible, il existe la possibilité de contaminations des emballages PET usagé avec des substances provenant d'une utilisation inappropriée (stockage de produits ménagers, pesticides, gasoil, etc.) ou/et par contact avec des autres déchets. En effet, l'absorption de substances intrinsèques non prévues à l'origine, par le matériau polymère pose un risque sanitaire (AFSSA, 2006; Sax, 2010; Welle, 2011).

Depuis quelques années, l'industrie du recyclage a développé des procédés de nettoyage des éventuelles contaminations et régénération du PET usagé permettant sa réutilisation pour le contact avec les denrées alimentaires. De plus, depuis l'année 2008 a été mis en application le règlement européen N°282/2008/CE qui fixe la procédure à appliquer pour l'autorisation des ces procédés de recyclage des matières plastiques destinées au contact avec les denrées alimentaires. Plusieurs voies de valorisation du PET usagé ont été mises en place et ont été décrites par plusieurs auteurs (Awaja et Pavel, 2005; AFSSA, 2006; Welle, 2011). Nous allons aborder brièvement ces différents procédés:

a) Réutilisation directe des bouteilles

Cette technique consiste en un lavage à chaud des bouteilles PET avec des détergents en suivant une procédure similaire à celle pratiquée pour les bouteilles en verre. Ce type de recyclage est pratiqué dans certains pays européens comme les Pays Bas, l'Autriche et l'Allemagne. Le principal inconvénient de ce procédé est qu'il ne permet pas d'éliminer de façon efficace les éventuels contaminants absorbés par le polymère.

b) Recyclage chimique

Ce type de recyclage est basé sur la dépolymérisation du PET par des réactions de méthanolyse, glycolyse ou hydrolyse. Les monomères et les oligomères résultants sont purifiés et ensuite, repolymérisés pour donner un matériau équivalent au polymère initial.

c) Recyclage mécanique du PET

Les bouteilles PET collectées sont broyées en paillettes. Les paillettes sont lavées à chaud (70°C – 90°C) avec de la soude diluée ou des tensioactifs pour éliminer des polluants éventuellement présents sur surface du polymère. Cependant, Franz *et al.* (2004) ont rapporté que cette phase de lavage n'élimine pas certaines substances absorbées par le polymère. Le PET recyclé résultant de l'extrusion des ces paillettes, n'étant pas suffisamment pur pour le contact direct avec les aliments, est recouvert d'une couche de PET vierge pour la fabrication des emballages alimentaires. Cette couche de PET vierge agit comme une barrière fonctionnelle, c'est-à-dire, empêche la migration des substances contenues dans le PET recyclé vers l'aliment.

Les barrières fonctionnelles dans les bouteilles en PET vis-à-vis de la migration des substances ont été largement étudiées (Franz *et al.*, 1996; Pennarun, 2001; Feigenbaum *et al.*, 2005). Ces études ont été basées sur la prédiction de la migration des substances modèles en fonction de l'épaisseur de la barrière et la technologie de mise en œuvre des films et bouteilles en PET multicouches. Deux facteurs sont déterminants pour l'efficacité des barrières fonctionnelles (Welle, 2011):

- L'épaisseur de la couche de PET vierge dans le produit fini. Cette épaisseur doit être sélectionnée à partir de la concentration des polluants dans le PET recyclé.
- Le contrôle de la température pendant le soufflage de la préforme multicouche. Une température élevée fait augmenter le coefficient de diffusion des substances intrinsèques présentes dans le PET recyclé vers la couche de PET vierge.

d) Recyclage mécanique avec décontamination du PET

Le recyclage mécanique, précédemment décrit (broyage en paillettes, lavage et séchage du PET), peut être suivi par différents procédés de traitement pour la décontamination du PET et la fabrication des bouteilles à usage alimentaire. Plusieurs technologies ont été développées au cours de ces années. De façon générale, les procédures de décontamination se basent sur la combinaison des traitements thermiques avec des températures aux alentours de 200°C, sous vide ou avec un gaz inerte et un traitement de surface avec des substances chimiques.

A notre connaissance, depuis l'année 2009 certaines marques d'eau embouteillée ont atteint en moyenne entre 25% et 50% du PET recyclé sur ces principaux formats des bouteilles (LC, 2009). Dans le cadre notre étude, comme indiqué, l'approvisionnement des bouteilles a été réalisé dans la grande distribution. Par conséquent, nous n'avons pas d'indications sur la quantité de PET recyclé des bouteilles testées. L'éventuelle présence de substances dans l'eau issues de la migration ne pourra pas être reliée au taux de recyclage des bouteilles en PET.

2.6 LES METHODES DE CARACTERISATION PHYSIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUES DU PET

Dans cette section, nous allons décrire les techniques qui ont été employées dans la présente étude pour caractériser l'état structural et la morphologie des bouteilles en PET. Ensuite, les principaux résultats seront détaillés pour aboutir avec la discussion et les conclusions qu'on peut extraire.

2.6.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) en réflexion totale atténué (ATR)

L'analyse infrarouge a été utilisée pour préciser la nature chimique et l'état structural du polymère. Les mesures ont été réalisées au centre de vieillissement naturel de Bandol. Au moyen de l'IRTF-ATR deux types d'expertises ont été réalisées (seule la phase exposée au soleil a été étudiée, la phase en contact de l'eau ne montre pas des modifications):

- La dégradation oxydative du PET des bouteilles des marques A et B par comparaison des spectres avant et après vieillissement naturel par exposition à la lumière solaire (irradiation totale de 237,9 MJ/m^2).
- La dégradation accélérée du PET des bouteilles des marques A et B au moyen d'une enceinte de photo-vieillissement (Artacc®) a été effectuée. Une comparaison des spectres avant et après vieillissement artificiel a été ainsi réalisée. Les caractéristiques techniques de cette enceinte de vieillissement sont présentées dans la section suivante.

2.6.2 L'enceinte de photo-vieillissement ARTACC®

Cette enceinte a été développée par la station d'essais de Bandol et permet de reproduire certains phénomènes naturels responsables des altérations chimiques des matrices polymères. Les cinétiques de dégradation sont accélérées par rapport au vieillissement naturel (http://www.stationdebandol.com).

Figure 2-11: Enceinte de photo-vieillissement ARTACC® (http://www.stationdebandol.com)

Cet instrument comporte une lampe au mercure qui se caractérise pour une émission négligeable dans l'UV C, un balance UV A /UV B voisine à celle du rayonnement solaire global à la surface de la Terre et une très faible évolution de la répartition spectrale pendant toute cette durée de vie. Le niveau d'irradiation UV nominal imposé aux échantillons correspond sensiblement à «2 soleils» ce qui permet une accélération du vieillissement, tout en étant encore représentatif du vieillissement naturel.

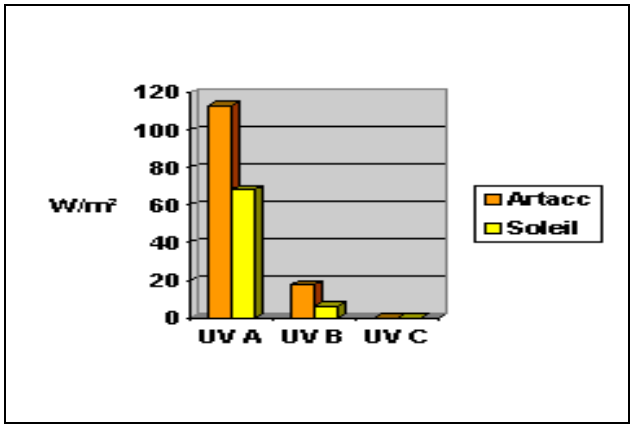


Figure 2-12: Comparaison de l'irradiation entre l'exposition naturelle au soleil et l'enceinte de photo-vieillissement (http://www.stationdebandol.com)

Le procédé de vieillissement se déroule par exposition des échantillons à la lampe à vapeur de mercure et à une température constante. Afin de garantir une exposition uniforme à la lumière artificielle et à la température sur toute la surface du polymère, une rotation des échantillons autour d'un axe horizontal au cours du vieillissement assure l'homogénéité.

Les échantillons de PET des marques A et B ont été découpés, puis exposés et placés dans des portoirs spécifiques. Les conditions de fonctionnement de l'enceinte ont été les suivantes:

- Irradiation dans l'UV: 245 MJ/m^2.
- Température d'exposition: 60°C.
- Heures d'exposition: 648 heures.

2.6.3 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La calorimétrie différentielle à balayage est une technique d'analyse thermique qui permet l'étude des transitions d'un polymère lors du chauffage ou du refroidissement de l'échantillon. Cette technique a été utilisée pour déterminer la température de transition vitreuse (Tg) et le taux de cristallinité initial (χ_c) de la phase partiellement cristallisée par étirage des bouteilles en PET avec un calorimètre DSC-131 Setaram. Les fragments de PET des bouteilles (environ 15 mg) ont été analysés de 20°C à 350°C avec une vitesse de chauffage de 10 K/min. A titre d'exemple, la figure 2-13 montre l'analyse calorimétrique réalisée par DSC pour un échantillon de PET amorphe.

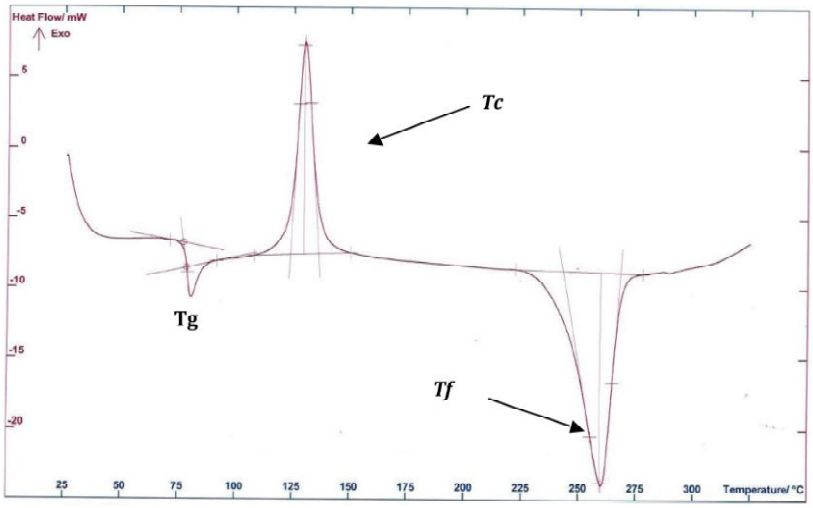


Figure 2-13: Analyse calorimétrique d'un PET amorphe

La température *Tg* est la température à laquelle le polymère passe d'un comportement solide à un comportement caoutchouteux. Dans cette étude, la détermination de cette température s'avère intéressante. En effet, quand le polymère atteint la *Tg*, les macromolécules de la phase amorphe acquièrent une forte mobilité, ce qui peut favoriser la migration des molécules contenues dans le PET vers l'eau embouteillée.

Le pic exothermique correspond à la température de cristallisation (T_c) du PET amorphe à partir de son état vitreux. Ainsi l'aire de ce pic permet d'obtenir l'enthalpie de cristallisation ΔH_c. Le pic endothermique de fusion indique la température de fusion (T_f) de la phase cristallisée du polymère ainsi que l'enthalpie de fusion (ΔH_f).

Le taux de cristallinité (χ_c) initial est calculé selon l'équation 2-1, où ΔH_f et ΔH_c sont l'enthalpie de fusion et cristallisation du polymère étudié, respectivement et ΔH_f^o correspond à l'enthalpie de fusion idéale du PET, fixée à 140 J/g par Liangbin *et al.* (2000).

$$\chi_c = \frac{(\Delta H_f - \Delta H_c)}{\Delta H_f^o} \qquad (2\text{-}1)$$

Le taux de cristallinité χ_c mesuré pour un panel de bouteilles commerciales est présenté dans la section 2.7.3. La DSC a été aussi employée pour l'identification de la nature des bouchons en étudiant la différence entre les températures de fusion du polyéthylène haute densité (PEHD) et le polypropylène (i-PP) de 120°C à 130°C et de 150°C à 175°C, respectivement (Wunderlich, 1980).

2.6.4 Spectrométrie mécanique à basse fréquence

Cette technique consiste à mesurer le module d'élasticité dynamique du matériau en fonction de la fréquence et de la température, selon l'équation suivante:

$$G^* = G \exp j\varphi = G' (1 + j \tan\varphi) \qquad (2\text{-}2)$$

Ces mesures permettent de caractériser la mobilité des chaînes macromoléculaires qui favorisent la stabilité thermique, ce qui a été utilisé pour déterminer la relaxation structurale et la température de transition vitreuse *Tg* de la phase amorphe de la partie partiellement cristallisée par étirage des bouteilles en PET.

L'instrument utilisé pour ces mesures est un spectromètre mécanique à basse fréquence haute résolution (David et Etienne, 1992; Etienne *et al.*, 2007). Cet appareil comporte une partie mécanique qui est un pendule de torsion travaillant en oscillations forcées. La contrainte est appliquée à l'échantillon est appliquée de façon électromagnétique et la déformation est mesurée par une méthode optique. La figure 2-14 montre la partie mécanique utilisée qui est spécialement adaptée aux échantillons de faible ou très faible épaisseur.

Figure 2-14: Partie mécanique de l'instrument utilisé dans cette étude pour les mesures d'élasticité dynamique du PET

L'instrument permet de déterminer le module d'élasticité dynamique en cisaillement par balayage de fréquences et/ou température. L'amplitude de déformation des mesures ne dépasse pas le 10^{-5}. Le module dynamique a été mesuré à plusieurs fréquences (généralement 0,09, 0,3 et 1 Hz) au cours de chauffages successifs à températures croissantes pouvant atteindre 115°C.

2.6.5 Diffraction de Rayons X (SAXS et WAXS).

La diffraction de Rayons X est une technique qui permet d'étudier la microstructure cristalline des polymères. Cette technique apporte des informations sur la taille, l'orientation et l'arrangement des chaînes polymériques dans les bouteilles PET.

L'étude de la morphologie cristalline du PET (taille, orientation et forme des structures cristallines) a été réalisée sur deux échelles différentes (Etienne et David, 2002):

- ***La diffraction aux grands angles (WAXS):*** qui permet d'obtenir des indications sur l'orientation et sur les distances intermoléculaires et intramoléculaires des chaînes polymériques qui constituent la phase cristalline du polymère.

- ***La diffraction aux petits angles (SAXS):*** qui permet la caractérisation de l'organisation microstructurale ayant une périodicité à plus grande distance qui se traduit par l'obtention de la longue période *(Lp)*. Pour les polymères cristallisés thermiquement, la *Lp* représente la distance entre les empilements de cristallites et la phase amorphe entre deux lamelles consecutives (cf. figure 2-15).

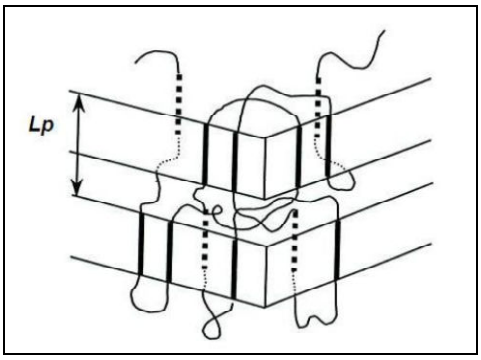


Figure 2-15: Illustration de la cristallisation d'un polymère à partir du liquide et la *Lp* (Etienne et David, 2002)

L'ordre de grandeur de la *Lp* peut être déduit à partir de la loi de Bragg:

$$Lp \approx 2\,\pi / q_{max} \qquad (2\text{-}3)$$

où q_{max} correspond au maximum du pic de l'intensité diffractée.

Comme indiqué, la morphologie et l'arrangement des cristaux ont été étudiés pour deux types de bouteilles en PET (marques A et B). Le but était de caractériser la structure semi-cristalline du PET tout au long de la bouteille, ce qui implique un grand nombre de mesures. Afin d'obtenir ce nombre important des données avec le minimum de temps possible, les études des bouteilles en PET ont été réalisées en utilisant le rayonnement Synchrotron (ESRF Grenoble, ligne D2AM) avec une énergie de faisceau de 16 keV. Un détecteur bidimensionnel (2D) a permis d'étudier les effets d'orientation. En ce qui concerne la marque B (bouteille multicouches), seule la couche de PET externe de la bouteille a été testée. La distance entre l'échantillon/capteur a été ajustée pour la diffraction en WAXS (d = 100 mm) et la diffraction en SAXS (d = 1870 mm). Le béhénate d'argent (AgBe) a été utilisé comme étalon de calibration des mesures.

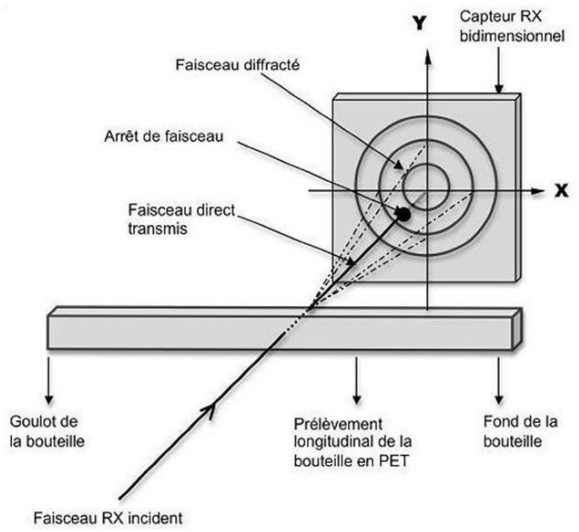


Figure 2-16: Dispositif expérimental utilisé sur la ligne D2AM (ESRF) pour les mesures de diffraction RX

Pour la réalisation des mesures un prélèvement longitudinal a été réalisé sur les bouteilles en PET d'essai (marque A et marque B). La mesure a été réalisée avec un pas de 1,5 cm à partir du goulot jusqu'à la partie inférieure de la bouteille.

2.7 RESULTATS EXPERIMENTAUX

2.7.1 Spectres IRTF en mode ATR après exposition naturelle à la lumière solaire des bouteilles

Sur les figures 2-17 et 2-18 sont présentées les spectres IRTF en mode ATR des bouteilles de la marque A et de la marque B, respectivement avant et après exposition naturelle dans des conditions contrôlées à la lumière pendant 10 jours (irradiation = 237,9 MJ/m^2).

Avant exposition solaire, les bandes caractéristiques du PET à 1340 cm^{-1} et à 1370 cm^{-1} sont clairement observées. Ces bandes correspondent aux conformations *trans* et *gauche* des unités d'éthylène qui forment les chaînes du polymère, respectivement. La conformation *trans* est favorisée par cristallisation induite par étirage de la phase amorphe, tandis que les conformations *gauche* sont caractéristiques de l'état amorphe. La présence de copolymères ou additifs liés au procédé de fabrication des bouteilles n'a pas été mise en évidence.

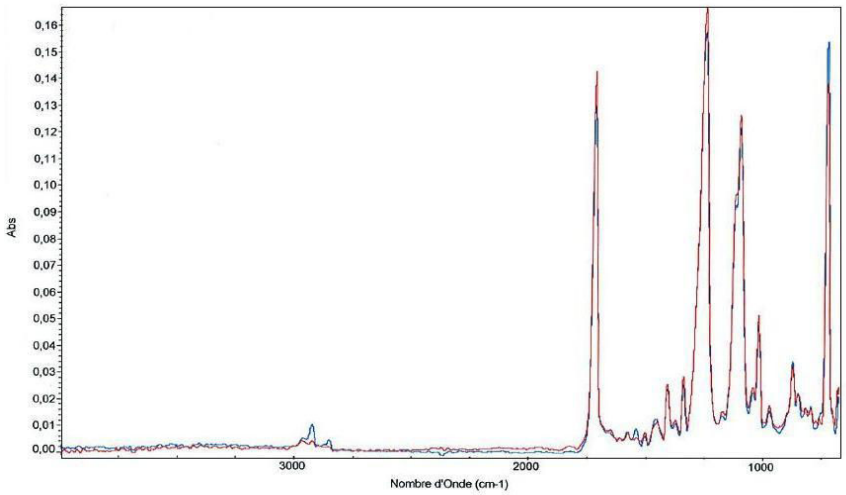


Figure 2-17: Spectres IRTF-ATR avant (tracé rouge) et après 10 jours d'exposition à la lumière naturelle du soleil (tracé bleu) pour les bouteilles de la marque A

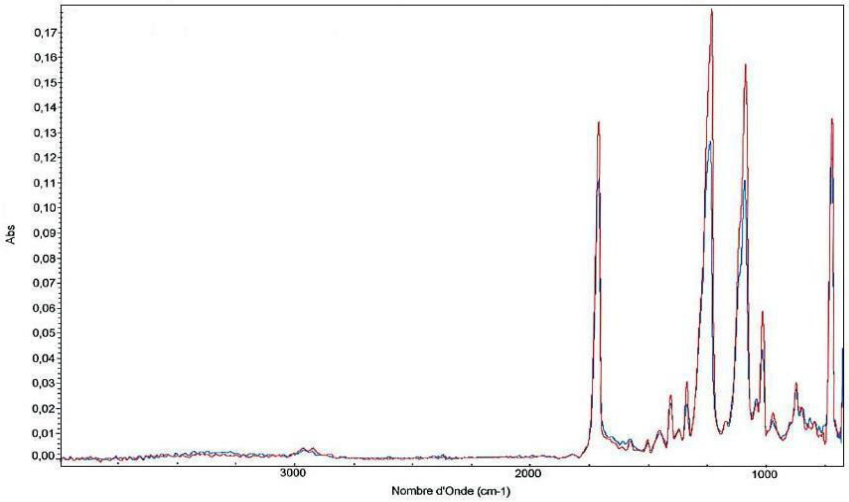


Figure 2-18: Spectres IRTF-ATR avant (tracé rouge) et après 10 jours d'exposition à la lumière naturelle du soleil (tracé bleu) pour les bouteilles de la marque B

Sur la figure 2-17, une diminution d'intensité au niveau des bandes spectrales situées entre 2918 cm^{-1} et 2850 cm^{-1} liées à la présence de groupements CH_2 dans la chaîne polymérique est observée par comparaison des spectres avant et après exposition du PET de la marque A. Une diminution au niveau de l'intensité des pics après une irradiation naturelle de 237,9 MJ/m^2 serait due à une scission de la chaîne polymérique qui provoquerait une diminution de la concentration des ces groupes CH_2 (Naït-Ali, 2008).

2.7.2 Spectres IRTF en mode ATR après vieillissement artificiel accélérée avec l'enceinte ARTACC®

Sur les figures 2-19 et 2-20 sont représentés les spectres IRTF-ATR obtenus après le vieillissement accéléré dans les conditions auparavant indiquées.

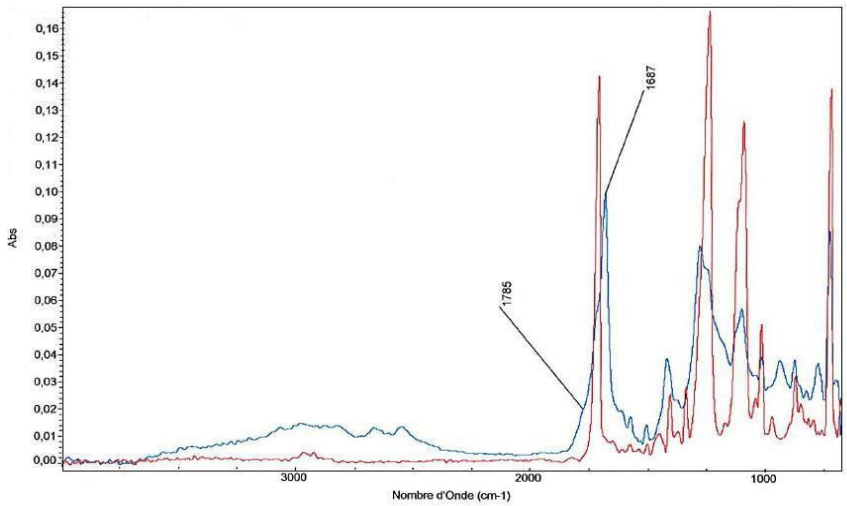


Figure 2-19: Spectres IRTF-ATR avant (tracé rouge) et après 648 h de vieillissement artificiel accéléré (tracé bleu) pour les bouteilles de la marque A

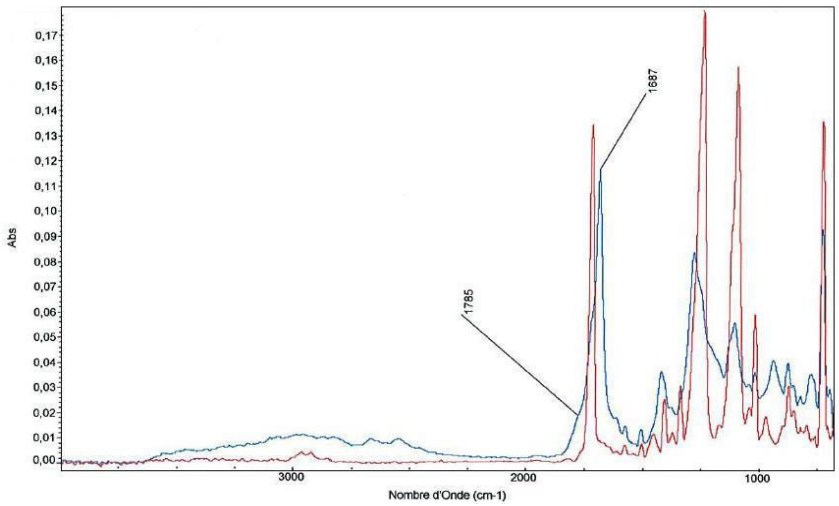


Figure 2-20: Spectres avant (tracé rouge) et après 648 h de vieillissement artificiel accéléré (tracé bleu) pour les bouteilles de la marque B

En exposition accélérée, les spectres du PET des bouteilles des marques A et B évoluent et mettent en évidence l'apparition des massifs classiques d'oxydation, plus particulierement les produits carbonylés lourds adsorbant à 1875 cm^{-1} et les acides benzoïques adsorbant vers 1690 cm^{-1}.

2.7.3 Résultats de l'analyse calorimétrique.

Les mesures calorimétriques effectuées sur le PET des deux marques commerciales (marque A / marque B) sont représentées sur les figures 2-21 et 2-22. Le taux de cristallinité calculée pour un panel de 10 bouteilles commerciales et la nature des bouchons sont présentées dans le tableau 2-3.

Tableau 2-4: Taux de cristallinité et nature chimique des bouchons pour un panel des bouteilles en PET

Water bottles	Type of water	Volume	Bottle Layers	Degree of Crystallinity (stretched zone)	Nature of caps (melting point)
Brand A	Non-carbonated mineral water	1,5 L	PET E	31%	HDPE (141°C)
Brand D	Carbonated mineral water	50 cL	PET E-PA-PET E	32%	HDPE (141°C)
Brand B	Non-carbonated mineral water	50 cL	PET E	36%	-
Brand C	Carbonated mineral water	1L	PET E-PA-PET E	31%	i-PP (174°C)
Brand E	Carbonated spring water	1,25 L	PET E	29%	-
Brand F	Non-carbonated mineral water	1 L	PET E	-	-
Brand G	Non-carbonated spring water	1,5 L	PET E	26%	-
Brand H	Carbonated mineral water	1,25 L	PET E	31%	-
Brand I	Non-carbonated spring water	50 cL	PET E	21%	HDPE (125°C)
Brand J	Non-carbonated mineral water	1 L	PET E	31%	HDPE (131°C)

[Les marques A et B correspond aux bouteilles testées dans ce travail].

De manière générale, on constate que le taux de cristallinité de la partie étirée des bouteilles testées est aux alentours de 30 % et que la plupart des bouchons testés sont en PEHD.

Sur la figure 2-21, il apparaît que le goulot de la bouteille PET de la marque A est pratiquement amorphe avec un taux de cristallinité qui ne dépasse pas le 14%. En fait cette valeur mesurée par calorimétrie est surestimée à cause des phénomènes de fusion / recristallisation. Une valeur de *Tg* de 72°C typique pour le PET amorphe ou très peu cristallisé a été mesurée (Etienne et David, 2002).

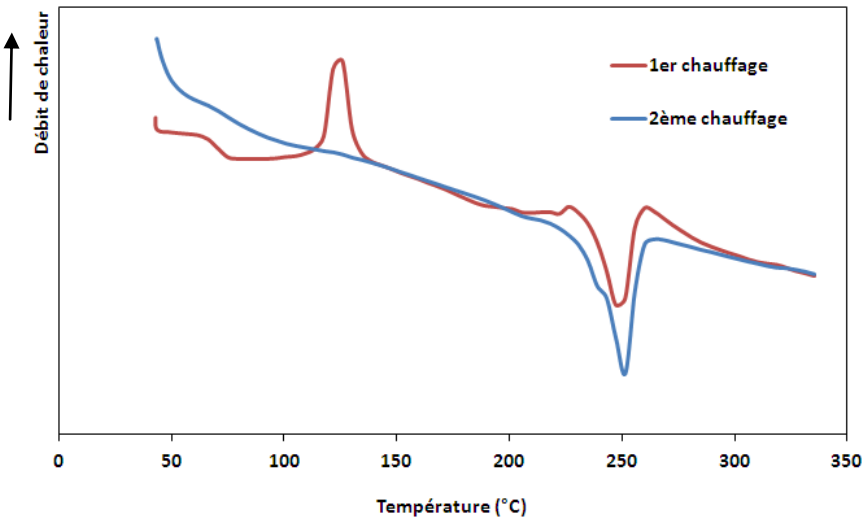


Figure 2-21: Thermogramme du goulot de la bouteille en PET de la marque A lors de deux chauffages successifs

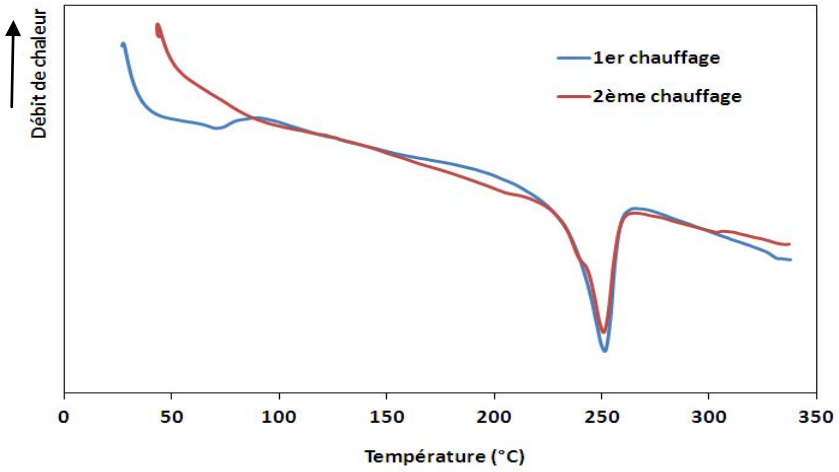


Figure 2-22: Thermogramme de la partie étirée de la bouteille en PET de la marque A lors de deux chauffages successifs

L'absence du pic exotherme de cristallisation sur les mesures pour la partie étirée de la bouteille de la marque A (cf. figure 2-22) confirme la cristallisation par étirage du PET durant le processus de soufflage de la bouteille.

On remarque qu'au début de la montée en température lors du premier chauffage apparaissent des irrégularités sur la ligne de base, non observées au cours du deuxième chauffage. Ce phénomène est du à un réarrangement des chaînes du polymère pendant le premier chauffage du polymère dans la capsule d'expérimentation. On constate ainsi que cette technique n'est pas assez sensible pour mesurée la *Tg* du PET semi-cristallin qui peut augmenter de 10°C par rapport à celle du PET amorphe (Etienne *et al.*, 1991). La spectrométrie de relaxation mécanique à basse fréquence a permis de déterminer cette valeur.

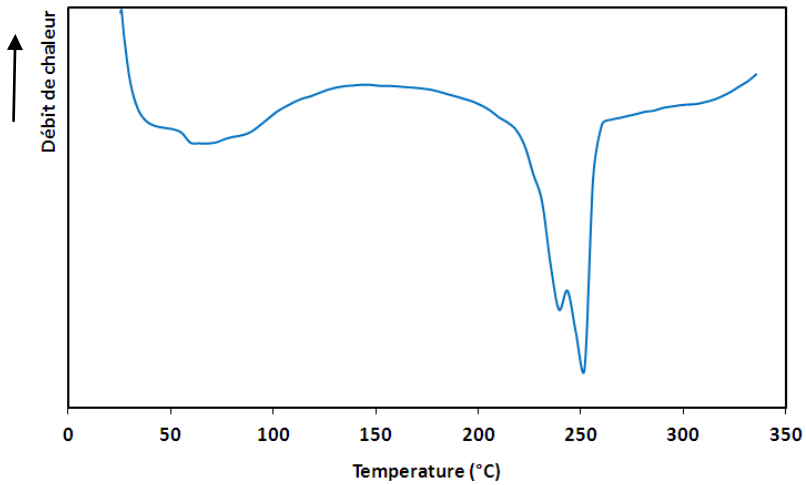


Figure 2-23: Thermogramme de la partie étirée de la bouteille en PET marque B lors du premier chauffage

Comme indiqué, les bouteilles de la marque B sont tricouches, c'est-à-dire, constituées d'une couche en PA entre deux couches de PET. Seule la couche en PET de la partie étirée au contact avec l'eau a été testée. L'analyse calorimétrique du premier chauffage est présentée sur la figure 2-23.

Il apparaît sur l'endotherme un dédoublement du pic de fusion à cause des traces de PA restées présentes dans le matériau PET. Si cette hypothèse est exacte le taux de cristallinité est légèrement surestimé pour la partie étirée de la marque B par rapport à la présence du PA. Rappelons que dans les cas des polymères cristallisés thermiquement, ce dédoublement du pic de fusion est attribué à une double population de lamelles d'épaisseurs différentes. La séparation des trois couches pour le goulot de la bouteille de la marque B s'est avérée impossible, par conséquent les mesures calorimétriques n'ont pas été poursuivies.

2.7.4 Résultats de spectrométrie de relaxation mécanique à basse fréquence

Les mesures des mouvements moléculaires de la bouteille PET de la marque A sont représentés dans les figures 2-25 et 2-26.

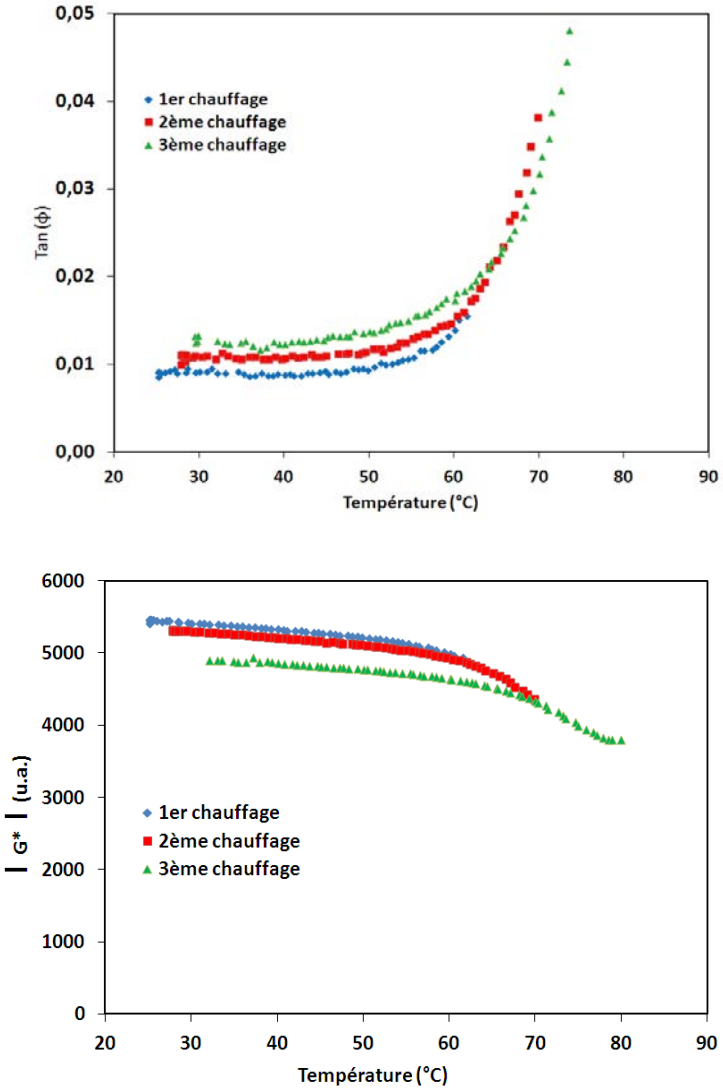


Figure 2-24: Variation du coefficient tan(φ) et du module dynamique |G*| au cours de trois chauffages successifs mesurées à 0,3 Hz pour le PET des bouteilles de la marque A

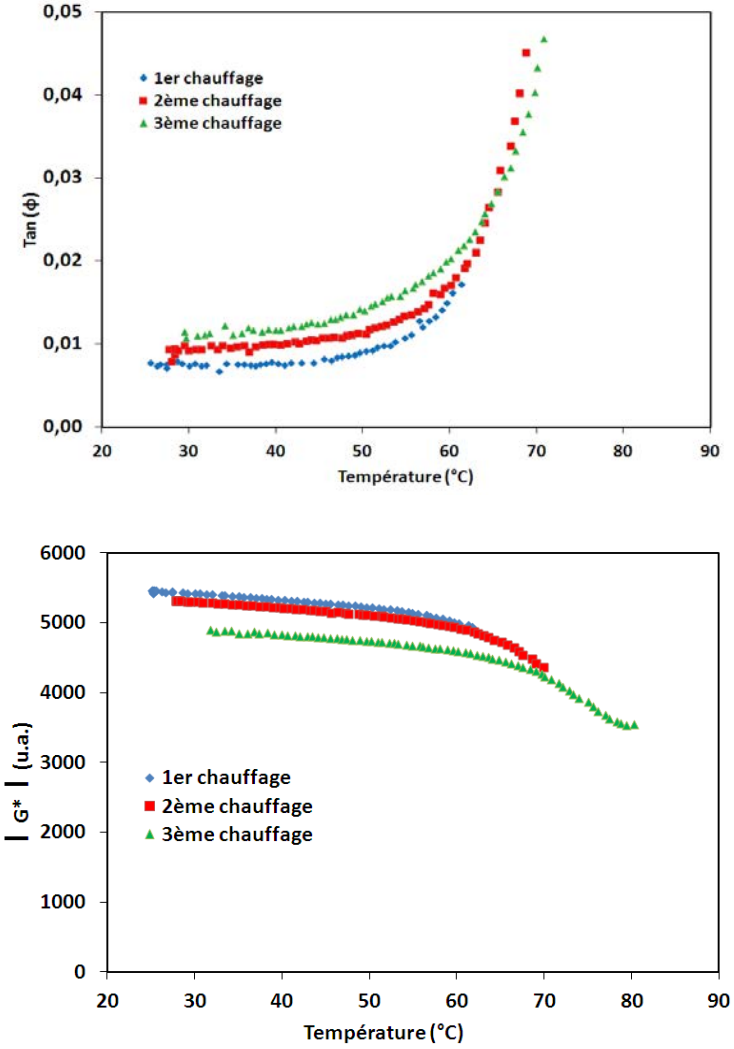


Figure 2-25: Variation du coefficient tan(φ) et du module dynamique |G*| au cours de trois chauffages successifs mesurées à 1 Hz pour le PET des bouteilles de la marque A

Pour les deux fréquences testées, les résultats indiquent une évolution du matériau PET à partir de 60°C ce qui se manifeste par une augmentation du coefficient tan φ et une légère diminution du module élastique |G*|. Lors d'expériences précédentes rapportées par Bach *et al.* (2011), il a été observé une diminution du coefficient de tanφ et une augmentation du module élastique dès 40°C, lors d'un premier chauffage. Cet effet été attribué à une relaxation structurale entraînant une augmentation de la compacité des unités structurales et donc une diminution de leur mobilité. En fait, ici il a été observé nous l'effet inverse, nous attribuons cet effet à une perte d'orientation de la phase amorphe, illustrée dans la figure 2-8. Cette perte d'orientation entraîne une augmentation de la mobilité des chaînes de la phase amorphe.

Ceci montre bien que quand le matériau PET est chauffé les mouvements macromoléculaires des chaînes dépendent fortement de la cristallinité de la bouteille et de la microstructure obtenue lors de sa cristallisation par étirage (paramètres lors de la mise en forme).

A partir de cette technique, la transition vitreuse de la partie étirée de la bouteille de la marque A a été clairement mise en évidence. Comme indiqué dans la section 2.7.3, la DSC s'est révélée moins sensible. Le domaine de transition vitreuse entraînant une relaxation structurale de la phase amorphe démarre dès 60°C. La transition vitreuse au sens classique du terme est de l'ordre de 82°C pour ce qui concerne la phase amorphe de la partie semi-cristalline.

2.7.5 Résultats de la diffraction de rayons X en WAXS

Sur les figures 2-26, 2-27, 2-28, 2-29 sont représentées les mesures de diffraction à grands angles (WAXS) pour les bouteilles des marques A et B.

L'ensemble des résultats montre que le goulot des bouteilles est amorphe et isotrope donc non étiré. Les premières mesures réalisées sur la partie étirée des deux marques de bouteilles (d = 2,5 cm pour les bouteilles de la marque A et d = 4,5 cm pour les bouteilles de la marque B) indiquent la cristallisation par étirage avec l'apparition et l'augmentation des raies cristallines avec une forte anisotropie d'orientation, ce qui est compatible avec un étirage uniaxial. Cette anisotropie d'orientation cristalline dans le plan XY a tendance à disparaître vers le corps de la bouteille. Ce qui est logique parce que dans cette zone l'étirage est biaxial, donc longitudinal et radial.

Les résultats sont qualitativement comparables pour la bouteille de type B. La couche interne au contact de l'eau a été étudiée. La forte intensité des pics $(0\bar{1}1)$ et (010) semble indiquer que les chaînes macromoléculaires sont dans le plan du film. La répartition spatiale des axes cristallins nécessiterait une étude des figures de pôles, étude que nous n'avons pas réalisée. Une étude complète montrerait que les chaînes ont tendance à s'aligner dans le sens de l'étirage et que les cycles benzéniques ont tendance a être dans le plan du film (Aubert, 1998).

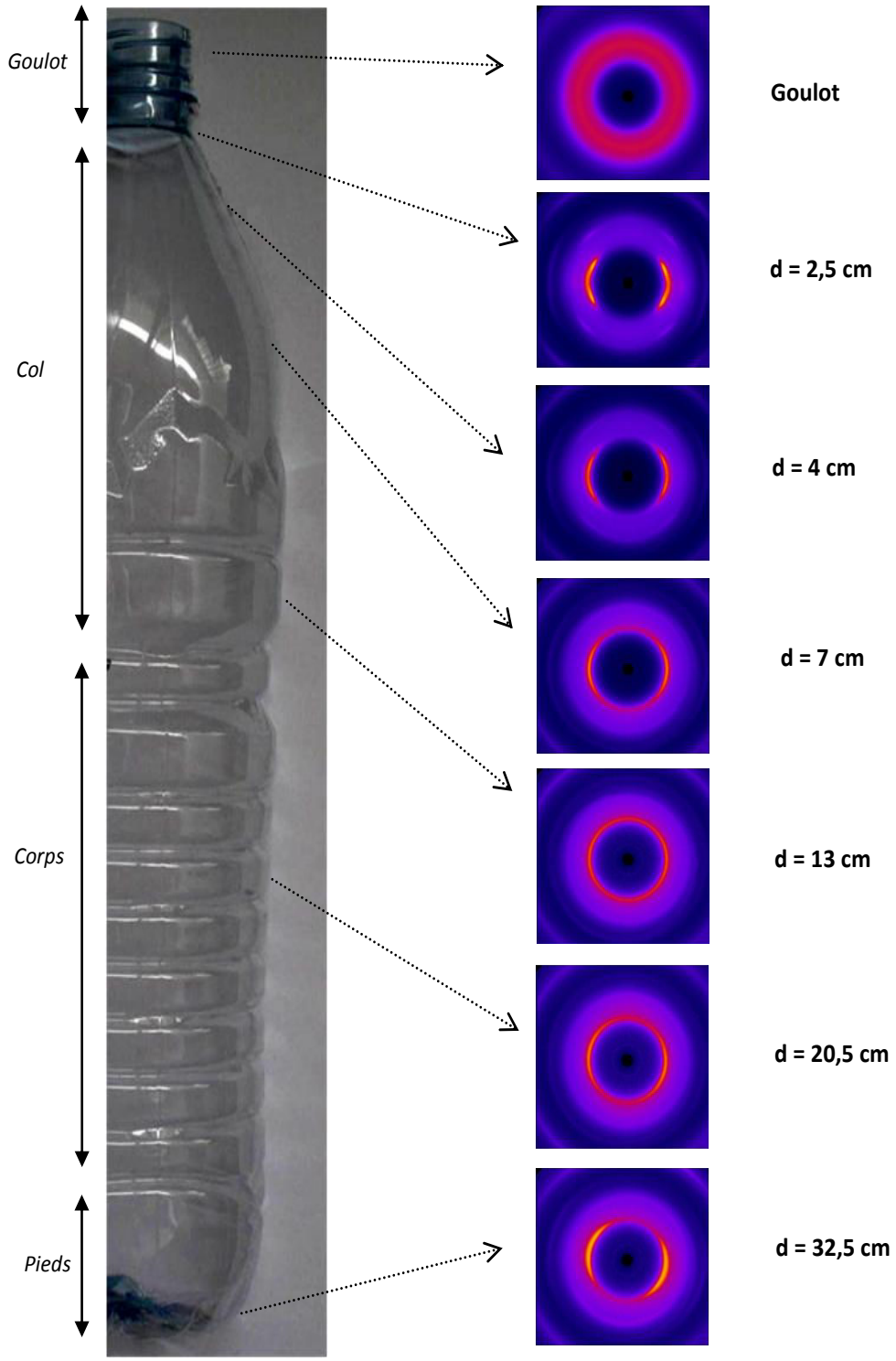


Figure 2-26: Diffractogrammes RX grands angles (WAXS) pour la bouteille PET de la marque A obtenus à l'aide d'un détecteur bidimensionnel (*d* représente la distance de mesure sur l'échantillon)

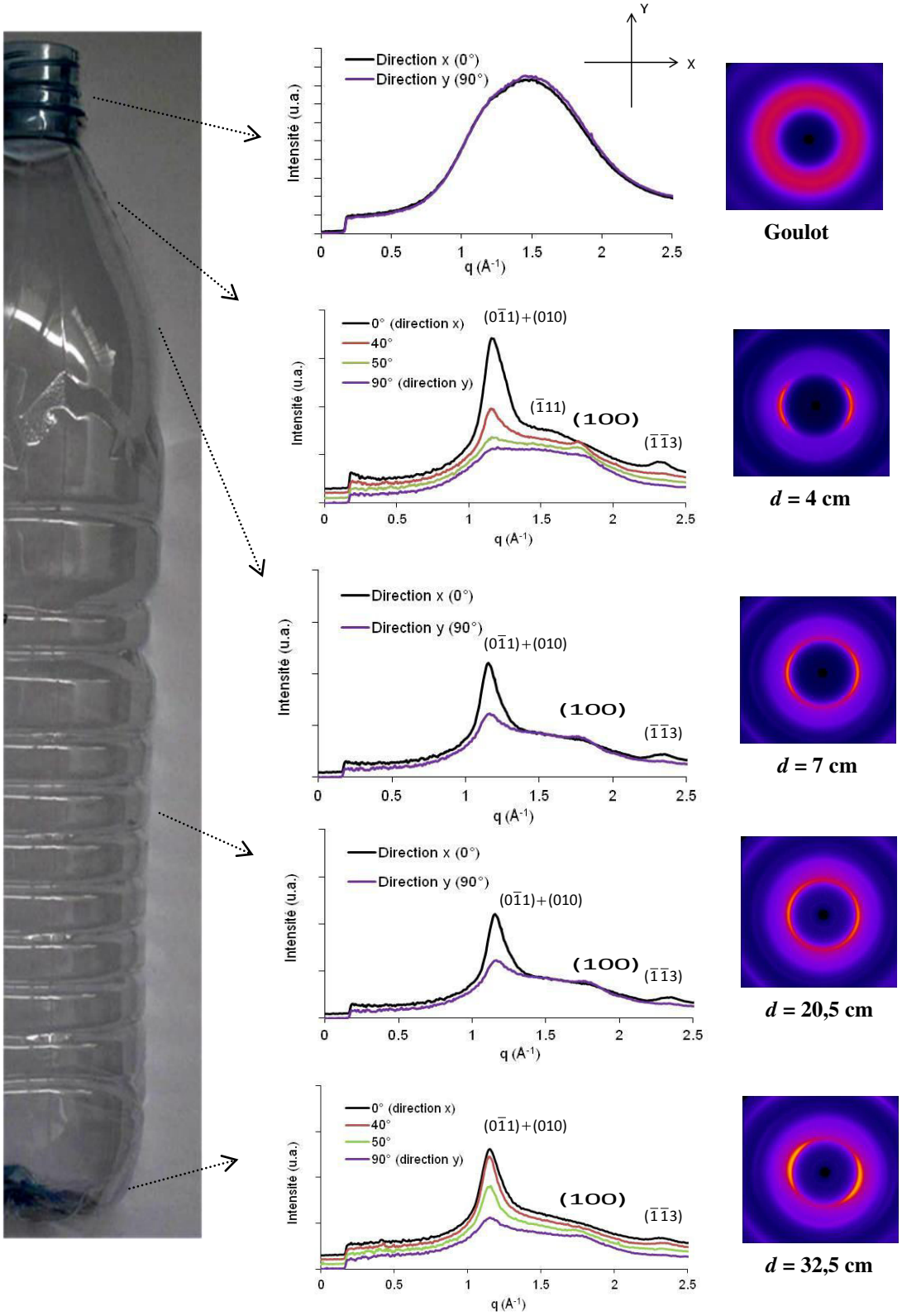


Figure 2-27: Diffraction RX grands angles (WAXS) pour la bouteille de la marque A avec la position des raies caractéristiques du PET à chaque distance de mesure de l'échantillon.

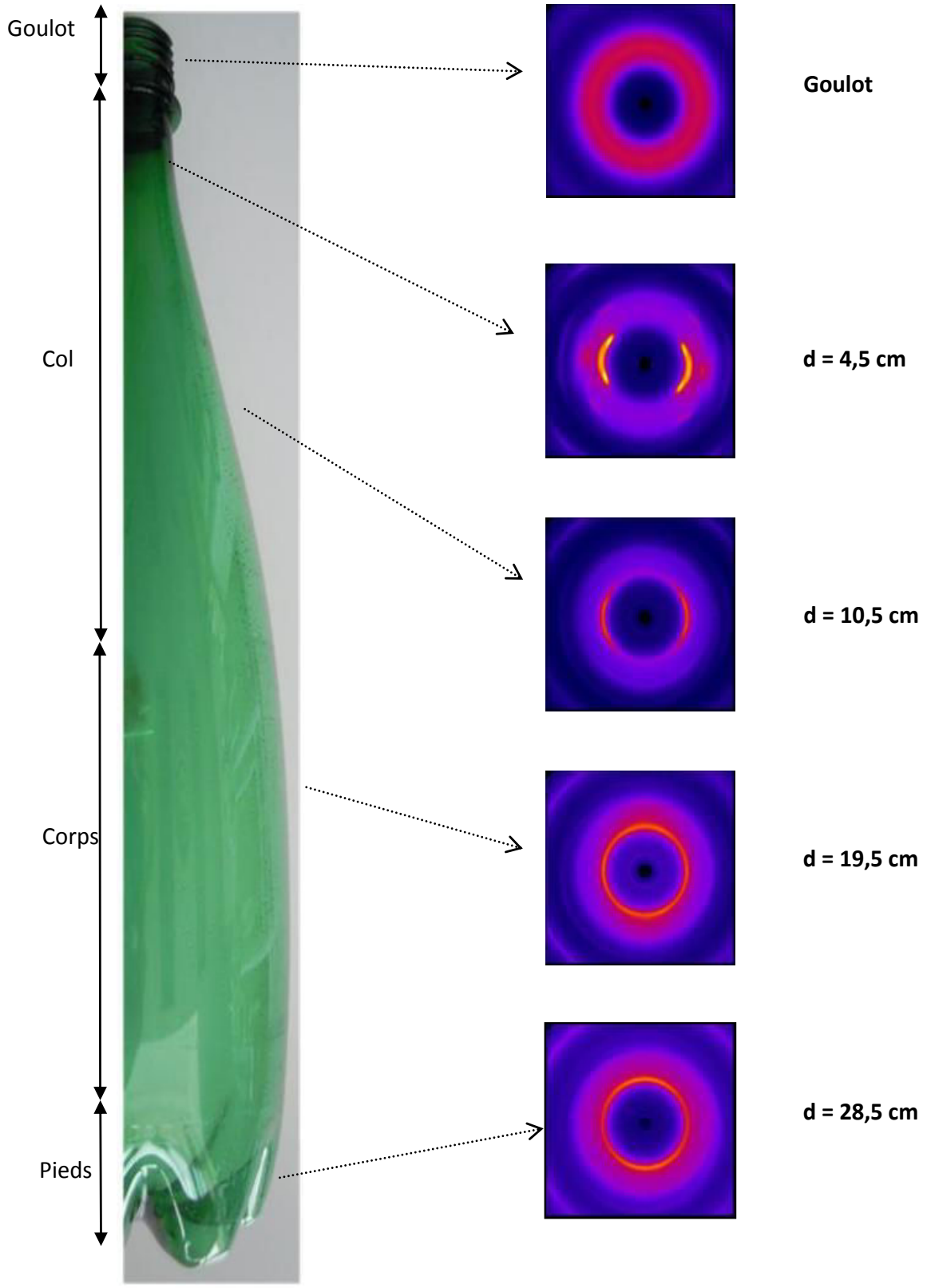


Figure 2-28: Diffractogrammes RX grands angles (WAXS) pour la bouteille de la marque B obtenus à l'aide d'un détecteur bidimensionnel (*d* représente la distance de mesure sur l'échantillon)

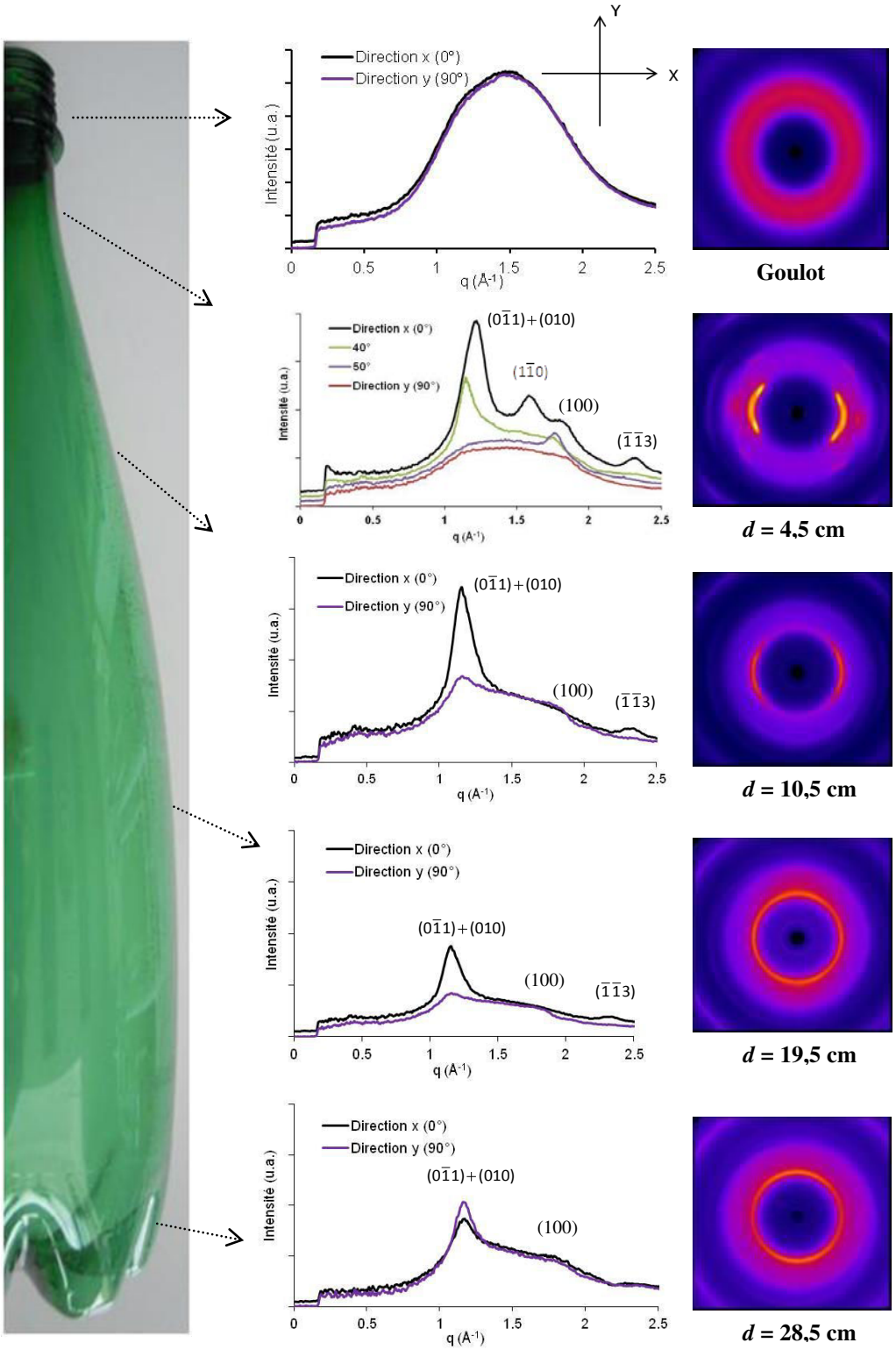


Figure 2-29: Diffraction RX grands angles (WAXS) pour la bouteille de la marque B avec la position des raies caractéristiques du PET à chaque distance de mesure de l'échantillon.

2.7.6 Résultats de la diffraction de rayons X en SAXS

Sur les figures 2-30, 2-31, les diffractogrammes obtenus pour le PET de la bouteille de la marque A sont exposés. Les résultats de diffraction pour la bouteille PET de la marque B sont représentés dans les figures 2-32 et 2-33.

La même tendance à l'anisotropie se retrouve sur les diffractrogrammes SAXS, les observations sur les deux bouteilles sont qualitativement comparables. La première mesure dans la partie étirée des bouteilles montre un élargissement des taches de corrélation dans la direction horizontale (X). Cette observation correspond à une augmentation de la longue période (*Lp*), donc la distance moyenne entre cristallites formés des chaînes étiré (et non des lamelles des chaînes repliées) dans cette direction X qui se traduit par l'augmentation de l'anisotropie à cause de la cristallisation de la bouteille par étirage. Comme pour les mesures en WAXS, cette anisotropie a tendance à diminuer en s'approchant du corps de la bouteille. Cela implique que les *Lp* calculées dans les directions X et Y sont identiques sur le corps des bouteilles PET.

L'absence de diffusion aux petits angles indique que le goulot est bien resté amorphe en accord avec les mesures WAXS et les mesures DSC. Les simples mesures en transmission n'ont pas permis d'établir avec exactitude le taux de cristallinité. Il a été réalisé juste par DSC qui n'est pas sensible à l'orientation.

L'ensemble d'observations rapportées dans ce chapitre a permis d'établir que le matériau de la bouteille présente un taux de cristallinité de 30% et que la partie amorphe est fortement orientée ce qui contribue à l'imperméabilité de la bouteille et à une réduction de la diffusion des différents migrats.

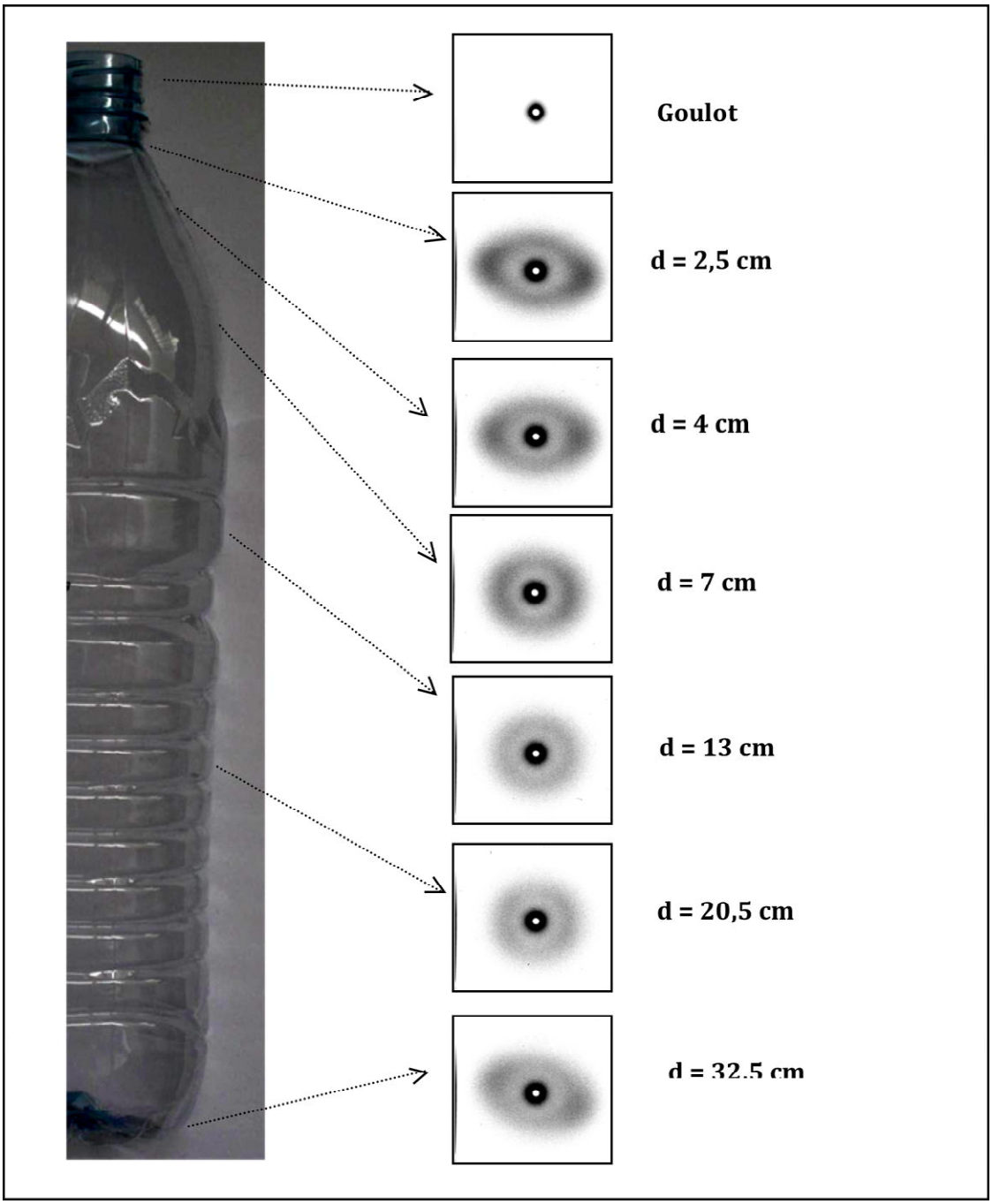


Figure 2-30: Diffractogrammes RX petits angles (SAXS) pour la bouteille de la marque A obtenus à l'aide d'un détecteur bidimensionnel (*d* = représente la distance de mesure sur l'échantillon)

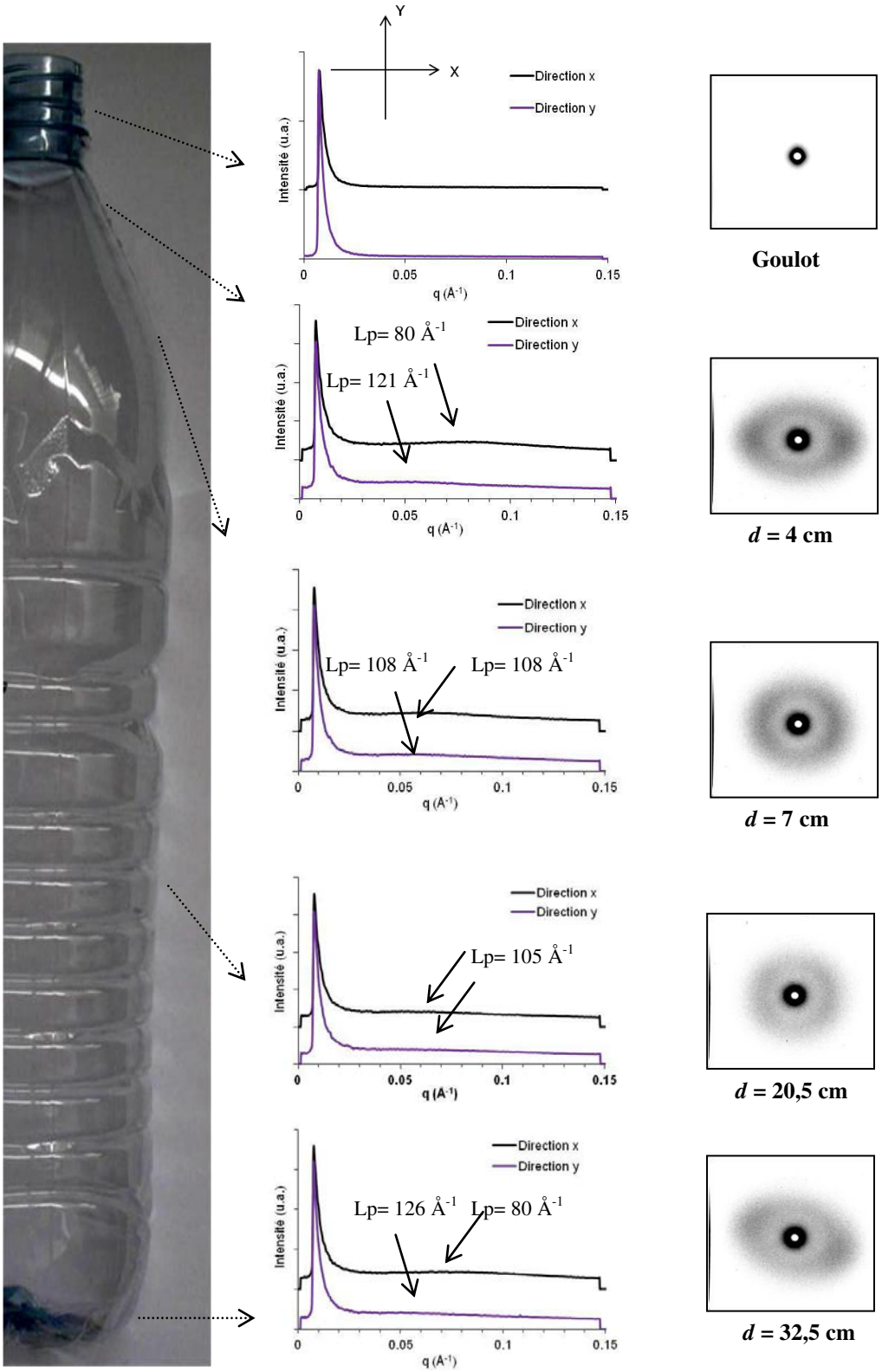


Figure 2-31: Diffraction RX petits angles (SAXS) pour la bouteille PET de la marque A. *Lp* est la distance de corrélation déduite de la position du maximum d'intensité diffractée *I(q)*.

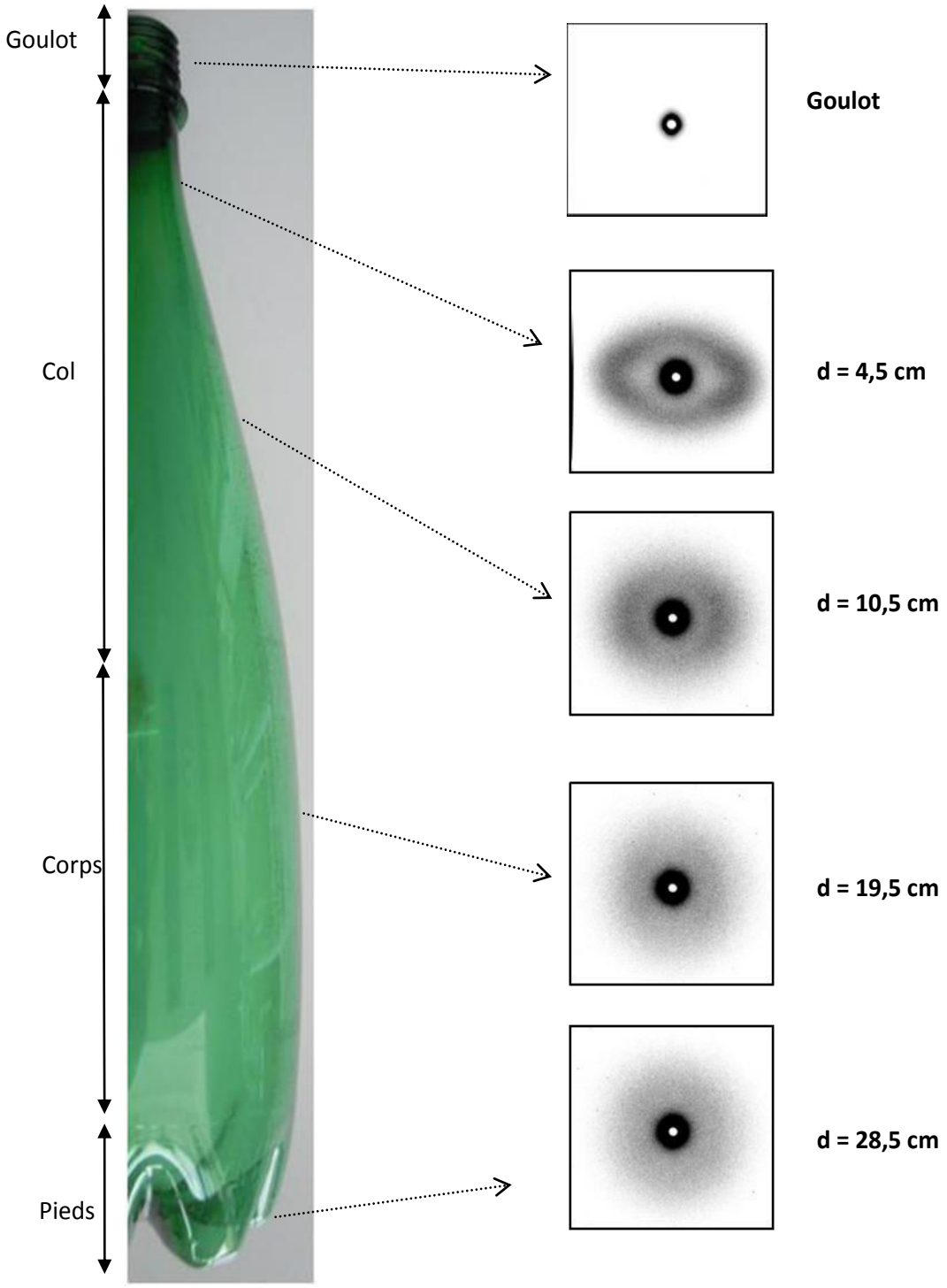


Figure 2-32: Diffractogrammes RX petits angles (SAXS) pour la bouteille de la marque B obtenus à l'aide d'un détecteur bidimensionnel (*d* = représente la distance de mesure sur l'échantillon)

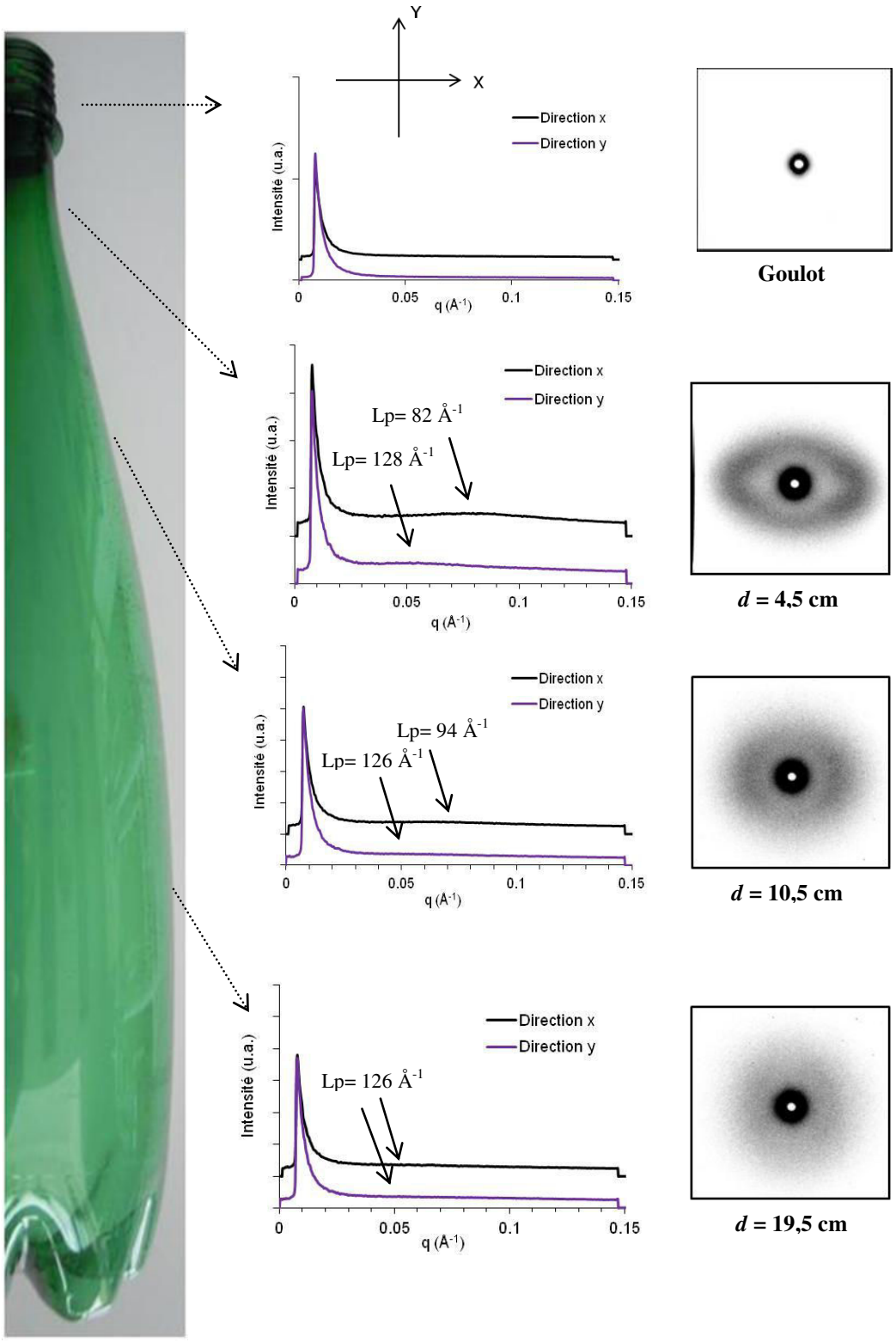


Figure 2-33: Diffraction RX petits angles (SAXS) pour la bouteille PET de la marque B. *Lp* est la distance de corrélation déduite de la position du maximum d'intensité diffractée *I(q)*.

Chapitre 3: IDENTIFICATION DES MIGRANTS POTENTIELS DU PET VERS L'EAU

L'objectif est de déterminer une liste de substances d'intérêt pour mener par la suite des essais de migration. Pour atteindre cet objectif, deux approches ont été développées: une première approche consistant à s'appuyer sur les données de la bibliographie et une seconde basée sur une approche expérimentale.

Dans le chapitre 1, l'approche bibliographique a été présentée au moyen d'un article de synthèse (section 1.6). Les composés carbonylés (formaldéhyde, acétaldéhyde, etc.) et les métaux (Sb, Co, Cu, etc.) ont été retenus comme migrants potentiels, car il est maintenant clairement établi que ce sont des produits de dégradation du PET, ou des catalyseurs et des colorants utilisés lors de sa synthèse.

Cependant, comme précédemment indiqué, certaines études évoquent la présence de substances *a priori* non attendues sur la base des produits déclarés comme entrant dans la formulation du PET. Ainsi, certains articles relatent la présence de plastifiants (phtalates et adipates), antioxydants, stabilisants UV, lubrifiants et alkylphénols (4-nonylphénol et BPA). D'autres auteurs ont mis en évidence la présence de composés à caractère non-intentionnel, les NIAS, issus des impuretés ou des dégradations des additifs utilisés dans la fabrication des matières plastiques. Beaucoup d'entre eux restent encore à identifier.

Ne connaissant pas la source exacte de ces molécules signalées de façon non systématique dans la littérature, la question de leur intérêt pour notre étude s'est posée. Pour y répondre, une approche expérimentale par vieillissement accéléré des bouteilles en PET a été effectuée, afin d'identifier une liste de molécules la plus exhaustive possible, issues de la migration du PET. Cette approche a consisté à exposer un panel de bouteilles en PET dans des conditions extrêmes de température et UV, de manière à accélérer au maximum la migration des composés du PET vers l'eau embouteillée.

Dans un premier temps, un protocole analytique de « screening » pour l'analyse qualitative de l'eau a été mis en place pour détecter une large gamme de composés. A l'issue, une liste de substances à prendre en compte dans la suite de l'étude a été établie. Ensuite une méthode multi-résidus pour l'analyse quantitative de ces composés organiques a été développée, afin d'apprécier les phénomènes de migration de ces substances depuis le PET vers l'eau.

Dans la première partie de ce chapitre, des généralités sur les techniques d'extraction et instrumentales utilisées spécifiquement dans le cadre de ce travail seront abordées. Ensuite, le protocole opératoire de la méthode analytique dite de « screening » sera présenté. L'échantillonnage des bouteilles et leurs conditions d'exposition seront ensuite argumentés et décrits. Enfin, à partir de la liste des molécules identifiées et de leur lien établi avec le matériau, une liste de migrants d'intérêt pour la suite de l'étude sera arrêtée.

Dans la deuxième partie du chapitre, le développement et la mise au point de méthodes analytiques dédiées à la détection et la quantification des molécules d'intérêt (mentionnés dans la section 1.8.2) seront détaillés. Ces méthodes quantitatives seront employées pour la réalisation de cinétiques migratoires, selon les conditions de température et exposition solaire, décrites dans la section 1.8.6.

3.1 PRINCIPES DES METHODES ANALYTIQUES UTILISES POUR LA METHODE «SCREENING»

Bien que les instruments d'analyse aient connu d'importantes avancées technologiques, dans la majorité des cas, il n'est pas encore possible de mesurer directement des solutés dans l'échantillon lui-même. Classiquement les protocoles analytiques intègrent plusieurs étapes:

Une première étape de préparation (dite de pré-concentration) permettant d'isoler et de transférer les molécules cibles, dans un solvant adéquat pour l'analyse. Cela implique que les échantillons soient traités par des procédés physiques et chimiques permettant de séparer les solutés de la matrice liquide.

Une deuxième étape de concentration qui consiste à évaporer le solvant d'extraction, soit jusqu'à un volume fixé, soit jusqu'à évaporation complète. Cette dernière technique impose une reprise du résidu par un autre solvant approprié à la méthode de séparation/détection.

A l'issue, la séparation et la détection des composés organiques sont réalisées.

En résumé, la qualification et la quantification des composés organiques au niveau des traces est le résultat d'une combinaison de méthodes de séparation et concentration avec des techniques instrumentales.

Actuellement, les techniques de préparation en chimie analytique sont nombreuses. On distingue des techniques classiques comme l'extraction liquide-liquide (LLE) et l'extraction sur phase solide (SPE) jusqu'à des protocoles d'extraction plus récents, moins laborieux et sans l'utilisation de solvant, comme par exemple la micro-extraction en phase solide (SPME) et l'extraction en phase solide par agitation d'un barreau adsorbant (SBSE).

En ce qui concerne les outils analytiques, la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase liquide (LC) couplées à la spectrométrie de masse sont largement utilisées pour la séparation et l'identification des composés organiques en raison de leur sensibilité et leur sélectivité.

Dans les paragraphes suivants, les techniques de préparation (LLE et SPE) et l'instrument d'analyse (GC-MS) employés dans la méthode dite de « screening » seront seules abordées. Le but n'est pas d'introduire de façon détaillée les fondements théoriques de ces techniques, mais d'expliquer brièvement leurs principes.

3.1.1 Les techniques de préparation

Bien qu'actuellement il existe des techniques de préparation moins laborieuses, plus rapides et nécessitant des volumes moindres de solvant, deux techniques de pré-concentration classiques ont été employées dans ce travail: l'extraction liquide-liquide (LLE) et l'extraction en phase solide (SPE). Ces deux techniques ont été retenues, car elles sont utilisées comme méthodes de références et sont facilement adaptables à des familles de molécules aux propriétés physico-chimiques très différentes. En outre, elles sont simples à mettre en œuvre et ne nécessitent pas d'équipements sophistiqués.

Les aspects généraux de ces deux techniques d'extraction retenues pour cette étude sont traités dans les paragraphes suivants (Hennion, 1999; Pichon, 2006; Farré *et al.*, 2008; Gru, 2010).

3.1.2 L'extraction liquide-liquide (LLE)

L'extraction liquide-liquide est un procédé qui permet la séparation des constituants d'un mélange en mettant à profit leur distribution inégale entre deux liquides pratiquement non miscibles. Cette technique est basée sur la mise en contact de deux phases liquides durant un temps suffisant pendant lequel les solutés sont transférés de la phase aqueuse de l'échantillon, dans le solvant.

L'utilisation d'ampoules à décanter permet la séparation des deux phases liquides (solvant/eau) par décantation gravimétrique. Le processus d'affinité, qui a lieu pour les analytes vis-à-vis de l'une de deux phases, est associé aux coefficients de partage entre un solvant organique (non miscible à l'eau) et l'eau.

Les paramètres qui doivent être optimisés sont les suivants:

- le ratio entre le volume initial d'échantillon et le volume de solvant d'extraction,
- le nombre d'extractions successives pour obtenir le meilleur rendement d'extraction,
- l'utilisation de mélanges de différents solvants et/ou la modification du pH de l'échantillon pour augmenter la sélectivité.

De plus, dans certains cas une fois la phase organique récupérée, il peut être nécessaire de réduire le volume de solvant, normalement par évaporation, afin de concentrer les solutés. L'évaporation de la phase organique peut engendrer la perte des composés volatils.

Les principaux inconvénients de cette technique de préparation sont la manipulation de grands volumes d'échantillon et de solvants, le grand nombre d'étapes et par conséquent, un risque élevé de perte des solutés ou/et des contaminations.

3.1.3 L'extraction sur phase solide (SPE)

Cette technique est maintenant une des méthodes les plus courantes pour la pré-concentration de composés organiques dans les échantillons d'eau. La SPE est basée sur la distribution des composés entre la phase liquide (l'échantillon) et une phase solide (l'adsorbant). Le soluté présentant une forte affinité vis-à-vis de l'adsorbant, il y reste totalement fixé au cours de la percolation de l'échantillon aqueux. Ensuite, le soluté est désorbé par un solvant approprié. L'obtention de facteurs d'enrichissement élevés repose sur la sélection d'un adsorbant adéquat conduisant à une rétention maximum des analytes et sur l'utilisation de conditions d'élution efficaces.

Comme le montre la figure 3-1, la SPE comporte généralement 4 étapes. Tout d'abord, le conditionnement de l'absorbant avec un solvant équivalent au solvant d'élution et puis un passage d'eau ultrapure (EUP). Ensuite, l'échantillon liquide est percolé à travers l'adsorbant. Certaines substances interférentes retenues en même temps que les analytes étudiés peuvent être éliminées par rinçage de l'adsorbant avec une solution de faible force éluante, afin de ne pas perdre les analytes. Ensuite, l'adsorbant peut être séché et puis les analytes sont élués avec un volume adéquat de solvant adapté pour rompre les interactions entre les solutés et l'adsorbant.

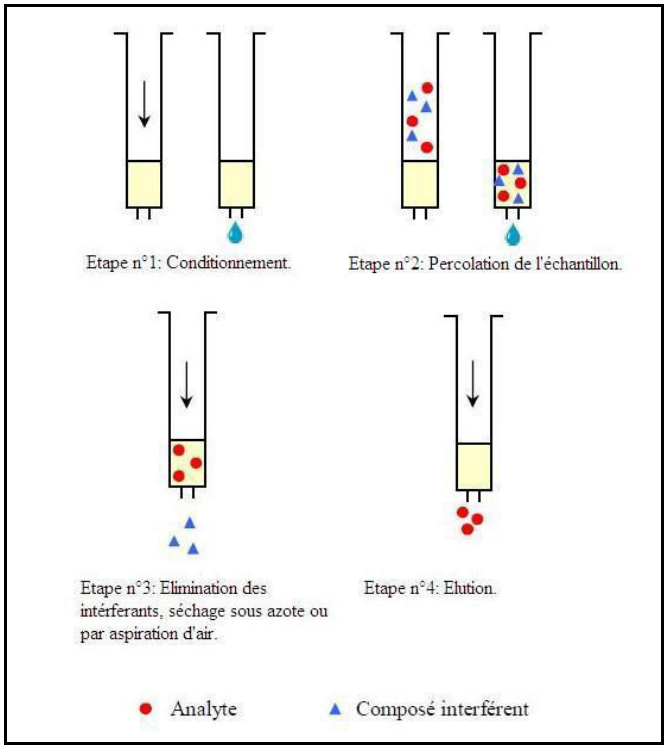


Figure 3-1: Description d'une procédure d'extraction sur phase solide (SPE) d'après (Pichon, 2006; Gru, 2010)

Habituellement, l'adsorbant est contenu dans une cartouche et inséré entre deux frittés (cf. figure 3-1). Les différentes étapes de la SPE peuvent être réalisées de façon séquentielle manuellement à l'aide d'unités d'extraction couplées à un système d'aspiration sous vide. La principale difficulté est de traiter de manière synchrone un nombre élevé d'échantillons. Cependant, certains fabricants ont commercialisé des dispositifs qui permettent l'automatisation de tout le processus de SPE.

On distingue trois principes de rétention des composés par l'adsorbant : la phase normale, la phase inverse et l'échange d'ions. Pour l'analyse de l'eau, les supports le plus utilisés sont ceux appartenant à la catégorie de la phase inverse.

L'extraction en phase inverse met en jeu la distribution des composés organiques d'une phase liquide polaire (comme l'eau) avec un adsorbant apolaire. Les interactions ont lieu entre les liaisons C-H des groupements fonctionnels de l'adsorbant et les liaisons C-H des analytes. Ces interactions sont dues aux forces d'attraction de basse énergie de type van der Waals, de dispersion ou de partition. L'utilisation d'un solvant non polaire permet la rupture des interactions avec l'adsorbant et donc l'élution des composés (Fritz, 1999).

On distingue plusieurs types de supports pour la SPE en phase inverse:

- **Les supports à base de silice vierge et fonctionnalisée** (C_8, C_{18}, diols, amines, nitriles) qui ont été les premiers adsorbants développés pour la SPE en phase inverse. Les plus utilisés sont les supports de silice greffée n-alkyle C_{18} en raison de leur capacité de rétention des analytes apolaires ainsi que ceux ayant une polarité modérée. Cependant, ces supports sont reconnus pour ne pas être très sélectifs et être limités au niveau du volume maximal d'échantillons et de la gamme de travail de pH (de 2 à 8) (Thurmann et Mills, 1998).

- **Le carbone graphite** est un autre support qui permet d'extraire des composés organiques très apolaires et très polaires. Il s'agit de supports hydrophobes qui retiennent les composés au moyen des interactions π-π entre l'adsorbant et les anneaux aromatiques de la molécule. De plus, la présence des charges sur la structure du support permet des mécanismes d'échange d'ions. Ce type de phase est utilisable sur une large gamme de pH et possède une capacité élevée d'adsorption, ce qui peut entrainer malheureusement, dans certains cas, la rétention irréversible des analytes.

- **Les copolymères apolaires à base de styrène et divinylbenzène** sont les phases le plus utilisées en SPE, car ils présentent un caractère hydrophile élevé ainsi qu'une meilleure stabilité de pH (gamme large de 1 à 14). Ces supports permettent d'effectuer un « screening » plus large en termes de polarité et possèdent une capacité d'adsorption plus élevée que les phases classiques. Les anneaux aromatiques du polymère permettent des interactions donneur-accepteur d'électrons et les liaisons π du soluté (Fontanals *et al.*, 2005).

Une grande variété de phases basées sur ces copolymères est commercialisée (cf. tableau 3-1). Leur structure chimique est commune, mais le mécanisme de polymérisation et la quantité de divinylbenzène varient entre les différents adsorbants, afin d'augmenter la polarité de la surface de l'adsorbant (León-González et Pérez-Arribas, 2000).

Tableau 3-1: Exemples des différents adsorbants polymériques pour l'extraction en phase solide (Fontanals *et al.*, 2005)

	Sorbent	Material	Supplier	Surface area (m^2/g)
Macroporous	Amberlite XAD-1	St-DVB	Rohm & Haas	100
	Amberlite XAD-2	St-DVB	Rohm & Haas	300
	Amberlite XAD-4	St-DVB	Rohm & Haas	⩾ 750
	PLRP-S-10	St-DVB	Polymer Laboratories	500
	PLRP-S-30	St-DVB	Polymer Laboratories	375
Hypercrosslinked	Envi-Chrom P	St-DVB hc.	Supelco	800–950
	Bakerbond SDB-1	St-DVB hc.	J.T. Baker	1060
	LiChrolut EN	St-DVB hc.	Merck	1200
	Styrosorb 2m	St-DVB hc.	Purolite International	910
	Styrosorb MT-43	St-DVB hc.	Purolite International	1050
	Styrosorb MN-150	St-DVB hc.	Purolite International	1070
	Chromabond HR-P	St-DVB hc.	Macherey-Nagel	1200
	HySphere	St-DVB hc.	Spark Holland	>1000
	Amberchrom GC-161m	St-DVB hc.	TosoHaas	900
Hydrophilic monomer	Amberlite XAD-7	MA-DVB	Rohm & Haas	450
	Amberlite XAD-8	MA-DVB	Rohm & Haas	310
	Oasis HLB	PVP-DVB	Waters	830
	Porapak RDX	PVP-DVB	Waters	n.d.
	Abselut Nexus	MA-DVB	Varian	575
	Discovery DPA-6S	Polyamide	Supelco	n.d.
Chemically modified	Bond Elut PPL	St-DVB c.m.	Varian	700
	Isolute ENV+	St-DVB-OH.	IST	1000–1100
	Strata X	St-DVB c.m.	Phenomenex	800
	Chromabond EASY	St-DVB c.m.	Macherey-Nagel	650–700
	Spe-ed Advanta	St-DVB c.m.	Applied Separations	n.d.

Hc, Hypercrosslinked; MA, Methacrylate; PVP, Polyvinylpyrrolidone; c.m., Chemically modified; n.d., No data.

3.1.4 Les techniques d'analyse

La chromatographie est une méthode analytique, qui permet la séparation des constituants chimiques de mélanges complexes. On distingue une grande diversité de systèmes et de techniques, mais toutes sont basées sur l'utilisation simultanée d'une phase stationnaire (papier, gélatine, silice, polymère, etc.) et d'une phase mobile (liquide, gaz ou fluide supercritique).

La tendance actuelle fait que les détecteurs conventionnels utilisés pour ces instruments sont maintenant remplacés par des spectromètres de masse qui permettent l'identification structurale des espèces séparées par le chromatographe. Ces couplages sont devenus courants pour les analyses multirésidus dans des matrices environnementales. Les deux couplages les plus utilisés actuellement sont la spectrométrie de masse avec la chromatographie liquide (LC-MS) ou avec la chromatographie gazeuse (GC-MS) (Skoog *et al.*, 1997; Farré *et al.*, 2008; Gru, 2010).

Dans le cadre de notre étude, la GC-MS a été privilégiée pour deux raisons. Tout d'abord, il existait au laboratoire un appareil de ce type relativement disponible. Ensuite, parce que cet instrument fonctionnait avec une trappe d'ions, détecteur plus adapté à l'identification de molécules inconnues que le triple quadripôle de la LC-MS. L'analyse qualitative en LC-MS est plutôt réalisée au moyen d'analyseurs type temps de vol (TOF), Qtrap ou Orbitrap®, non disponibles au laboratoire.

3.1.4.1 La chromatographie en phase gazeuse (GC)

Cette méthode d'analyse permet la séparation d'une ou plusieurs molécules d'un mélange. L'échantillon est volatilisé par chauffage sans décomposition et mélangé au gaz vecteur, ou «*phase mobile*». Puis les constituants du mélange sont introduits dans une colonne analytique recouverte d'un film chimique, la *phase stationnaire*. Les molécules sont séparées dans le temps, car elles migrent dans la colonne avec des vitesses différentes en fonction de leur volatilité et de leurs interactions avec la phase stationnaire. A la sortie de la colonne, les molécules sortent les unes après les autres et sont détectées. Chaque composé se caractérise pour un temps de rétention qui correspond au temps écoulé entre l'injection de l'analyte et son arrivée au détecteur. Cette technique s'applique pour l'analyse des composés organiques de natures très diverses (pesticides, résidus de médicaments, alkylphénols, phtalates, etc.), mais les composés doivent être de préférence relativement volatils, thermiquement stables et de faible polarité (Tranchant, 1995; Burgot et Burgot, 2002; Bouchonnet, 2009).

Le chromatographe en phase gazeuse est équipé des parties suivantes:

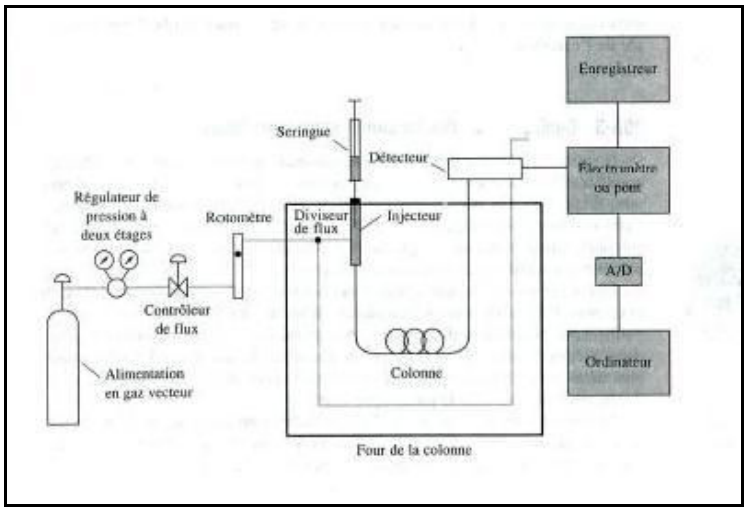


Figure 3-2: Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse d'après Skoog *et al.* (1997)

- **Un système d'injection**

Parmi les systèmes d'injection existants, le GC utilisé pour ce travail est équipé d'un injecteur à température programmée (PTV: *programmed temperature vaporizer*). Les injecteurs PTV (cf. **Figure 3-3**) sont constitués d'un système de chauffage qui permet d'injecter les échantillons à froid (aux alentours de 30°C-40°C), puis d'augmenter progressivement la température (en quelques secondes) jusqu'à 300°C. L'échantillon est alors volatilisé et transféré rapidement vers la colonne. L'injection à froid permet d'éviter l'absence de discrimination dans l'aiguille et minimise la dégradation thermique des substances thermolabiles.

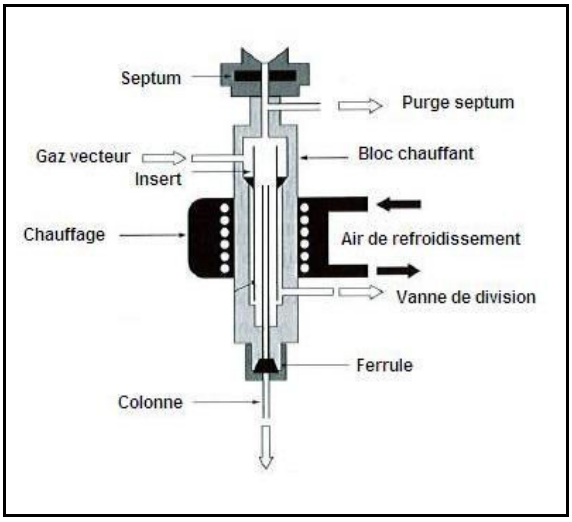


Figure 3-3: Schéma d'un injecteur-vaporisateur à température programmée utilisées pour cette étude, d'après Richardin (2001)

De plus, dans la configuration de l'appareil utilisé pour ce travail, une précolonne (tube de silice fondue désactivée de très faible rétention) est emboutée dans l'injecteur. Le but est de créer une zone de rétention la plus faible possible où les solutés, une fois injectés, migrent rapidement après que le solvant se soit évaporé. Les solutés se reconcentrent ensuite sur la colonne chromatographique. Un plus grand volume d'échantillon peut ainsi être injecté dans la colonne chromatographique, d'où une augmentation de la sensibilité de l'analyse, ainsi qu'une amélioration de la résolution des pics chromatographiques (Tranchant, 1995; Burgot et Burgot, 2002).

- **Le four et la colonne capillaire**

L'élément clé pour une bonne séparation des analytes est la colonne chromatographique. Les colonnes capillaires sont des tubes en silice fondue avec une paroi interne recouverte d'un film (la phase stationnaire) greffé avec des fonctions chimiques différentes selon le type de colonne. Les diamètres internes les plus utilisés sont 0,25 et 0,32 µm, pour des longueurs allant de 10 à 50 m. La colonne est placée dans un four, qui permet de programmer la température durant la séparation chromatographique, l'interaction entre les composés et la phase stationnaire étant fonction de la température (Tranchant, 1995; Bouchonnet, 2009).

- **Un système de détection**

Un signal est émis, lorsque le détecteur repère les molécules mélangées au gaz vecteur qui sortent de la colonne. Des logiciels informatiques d'acquisition de données propres aux constructeurs permettent l'enregistrement et le tracé de ce signal sous forme de chromatogramme.

Cependant, l'identification des molécules est basée sur leur temps de rétention, par comparaison avec l'injection de substances étalon. Seule la spectrométrie de masse (MS) en couplage avec la GC permet l'identification plus précise des molécules. Les principes généraux de cette technique sont abordés ci-dessous.

3.1.4.2 La spectrométrie de masse (MS)

Cette technique analytique permet l'identification des analytes en se basant sur des spectres de masse (charge des ions détectés (m/z) et ratio relatif entre ces différents ions). Les spectromètres de masse sont constitués des éléments suivants (Cotter, 1992; Gross et Caprioli, 2006; Bouchonnet, 2009):

- *Une source d'ionisation* où sont produits les ions gazeux.
- *Un analyseur* qui permet la séparation des ions former dans la source. Il existe différents modes d'acquisition programmables (Full scan, SIS, µSIS, MS/MS, etc.).
- *Un détecteur* qui mesure le courant induit par les ions qui traversent l'analyseur.

Dans le paragraphe suivant, ces éléments sont décrits en abordant principalement la configuration de l'instrument utilisé pour ce travail.

- **La source d'ionisation**

Elle permet d'ioniser les molécules gazeuses présentes dans l'échantillon. Dans le couplage GC-MS, il existe deux modes d'ionisation: l'ionisation électronique (EI) (plus souvent appelée « impact électronique ») et l'ionisation chimique (CI).

Dans ce travail, c'est l'EI qui a été utilisée. Le principe est de soumettre les molécules gazeuses à un faisceau d'électrons de haute énergie. Cette énergie permet d'arracher un électron à la molécule M, qui conduit à la formation d'un ion radicalaire M^+. L'EI a été privilégiée, car elle fournit plus d'informations structurales que la CI, cette dernière étant un mode d'ionisation plus doux et sélectif, donnant plutôt des informations sur le poids moléculaire des molécules (Bouchonnet, 2009).

- **L'analyseur**

L'instrument employé pour cette étude, est équipé d'un analyseur quadripolaire: une trappe ionique (« piège à ions ») à source externe (cf. figure 3-4). Les ions se forment dans la source, puis ils sont extraits, accélérés et focalisés dans l'analyseur de manière séquentielle. Le piège à ions est constitué de trois électrodes métalliques: une annulaire et deux dites « chapeau ». Ces électrodes sont isolées par des isolants électriques. Les deux électrodes « chapeau » sont percées en leur centre, permettant ainsi l'introduction et l'éjection des ions vers le détecteur. La gamme de travail m/z balayée par l'analyseur est fixée par l'utilisateur, l'appareil utilisé pouvant travailler jusqu'à une valeur de 1000 m/z. (Miller et Denton, 1986; Bouchonnet, 2009).

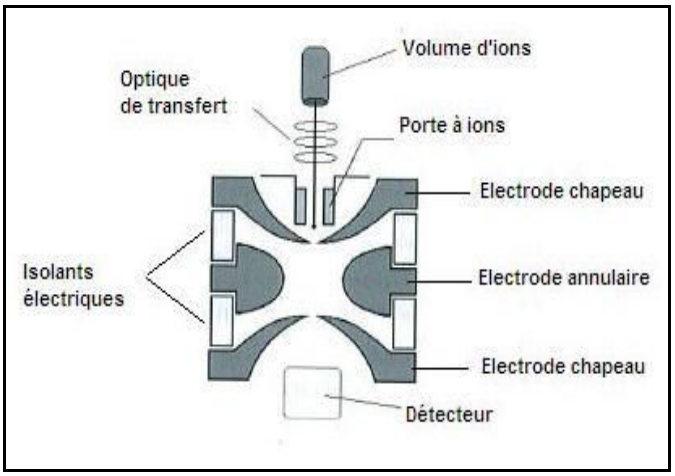


Figure 3-4: Schéma d'une trappe ionique à source externe d'après Bouchonnet (2009)

- **Le détecteur**

Il reçoit les ions et amplifie le courant pour le rendre détectable par l'électronique du système. L'appareil de la présente étude est équipé d'un multiplicateur d'électrons à dynode continue. Quand les ions arrivent au multiplicateur, cela se traduit par un signal. Tous ces signaux sont représentés sous la forme d'un spectre de masse.

Dans les couplages GC-MS équipés d'une trappe ionique, il existe plusieurs modes d'acquisition: le mode de balayage (dit *«Full Scan»),* le mode SIS (ou «Selected Ion Scan»), qui permet juste de détecter quelques ions sélectionnés, ou l'analyse en tandem MS/MS qui consiste à isoler un ion (dit «*parent*») et le fragmenter en ions *fils*. Dans le protocole de « screening » réalisé pour cette étude, le mode *«Full Scan»* a été utilisé, car il permet l'acquisition des spectres de source, c'est-à-dire des spectres où sont présents tous les ions produits dans la source à un instant donné (Bouchonnet, 2009). Les spectres de sources sont utilisés pour l'identification des analytes, et c'est pour cette raison que ce mode d'acquisition a été choisi. Des bases de données de spectres d'un grand nombre de molécules sont intégrées dans les logiciels de pilotage des GC-MS. Elles permettent l'identification des molécules par comparaison directe. Cependant, il est essentiel de réaliser des confirmations avec des standards analytiques purs des molécules. Dans certains cas, le recours à une interprétation fine du spectre est nécessaire pour attribuer à chaque m/z une structure chimique et s'assurer que les fragments proviennent bien de la molécule mère.

3.2 ELABORATION DU PROTOCOLE ANALYTIQUE DE BALAYAGE («SCREENING») DES COMPOSES ORGANIQUES DANS L'EAU EMBOUTEILLEE

Comme indiqué, le but était de mettre au point une méthode qualitative (sans quantification) la plus généraliste possible, afin d'identifier des composés de nature chimique différente dans l'eau. Habituellement, le choix et l'optimisation des techniques de préparation et d'analyse sont réalisés en fonction des caractéristiques physico-chimiques des composés organiques recherchés. La principale difficulté dans le présent cas a été donc d'élaborer un protocole analytique sans connaître la nature exacte des molécules recherchées. Il a fallu développer des protocoles suffisamment performants et polyvalents pour s'adresser à un large spectre d'analytes.

3.2.1 Protocole LLE

L'extraction des composés organiques au moyen de la LLE a été retenue sur la base de la norme XP P41-250-2. Celle-ci définit des méthodes d'essai destinées à évaluer l'effet des matériaux sur la qualité de l'eau destinée à la consommation humaine par rapport à la migration des micropolluants minéraux et organiques. Cette norme préconise l'extraction des composés organiques dans l'eau par du dichlorométhane, et une concentration de l'extrait obtenu. Le mode opératoire utilisé au cours de cette étude présente certaines modifications par rapport à celui de cette norme, afin de l'adapter aux moyens et aux équipements du laboratoire.

Le mode opératoire est le suivant:

L'ensemble de la verrerie a été séché à 250°C pendant 12h. Toute la verrerie a été bouchée si besoin avec de l'aluminium et stockée séparément du reste du matériel du laboratoire. Les bouteilles de solvants ont été exclusivement réservées pour ces analyses, afin d'éviter toute contamination. L'utilisation de matériel en plastique a été minimisée au maximum et l'emploi de matériel en Téflon® a été privilégié en raison de son inertie.

1. **Rinçage du dispositif d'extraction:**
   Le dispositif d'extraction (ampoule de décantation, entonnoir, tube de collecte et bécher) a été rincé avec 40 mL de dichlorométhane pendant 15 min.

2. **Réalisation d'un blanc du dispositif d'extraction:**
   Le blanc dispositif a été réalisé avec 160 mL de dichlorométhane (volume équivalent au volume total du solvant d'extraction des échantillons) en suivant la même procédure que les échantillons. Il s'agit d'une blanc « verrerie», qui permet de vérifier l'absence de matières actives dans le dispositif d'extraction /concentration utilisé. Ce blanc est réalisé sur chaque poste utilisé pour l'extraction des échantillons.

3. **Réalisation d'un blanc d'eau qualité LC:**
   Un poste avec eau ultrapure (eau réputée exempte de traces de composés organiques) est réalisé, afin de contrôler l'absence de contamination pendant la procédure d'extraction des échantillons.

4. **Procédure d'extraction des échantillons d'eau:**
   L'échantillon (1 000 mL) est extrait dans l'ampoule à décanter, 2 fois avec 80 mL de dichlorométhane. Chaque ampoule est agitée mécaniquement pendant 15 min. Après la décantation, les phases organiques sont séchées par passage sur du Na_2SO_4 et réunies. Les 160 mL de phase organique sont concentrés par évaporation du solvant. Celle-ci est réalisée au moyen d'une station TURBOVAP sous pression d'azote jusqu'à un volume final d'environ 1 mL. 1 mL d'acétate d'éthyle est ensuite ajouté et mélangé à l'extrait. Puis, l'extrait contenant le mélange de solvant est évaporé jusqu'à environ 300 µL. Au cours de cette dernière étape d'évaporation, les analytes sont transférés de la phase organique au dichlorométhane vers celle à l'acétate d'éthyle, solvant moins volatil et plus approprié pour la séparation chromatographique.

5. **Reprise des extraits:**
   Les extraits concentrés sont ajustés au volume exact de 300 µL avec de l'acétate d'éthyle et transférés dans des tubes en verre brun avec un insert conique de 200 µL. Les tubes sont obturés avec des bouchons en matière plastique recouverts de papier aluminium, afin d'éviter d'éventuelles contaminations par contact direct avec le matériau du bouchon. Les tubes sont ensuite stockés au congélateur (-4°C) avant analyse.

Les conditions opératoires pour la séparation chromatographique et l'identification sont présentées dans la section 3.2.3.

3.2.2 Protocole SPE

Les molécules susceptibles de migrer du PET vers l'eau sont plutôt polaires en raison de la nature même de l'eau. Par conséquent, un adsorbant ayant une capacité élevée de rétention, vis-à-vis, de ces composés s'avérait être un choix intéressant dans le cadre de cette étude. Cependant, le support devait être le moins sélectif possible, afin d'adsorber le plus grand nombre possible de molécules.

Dans le tableau 3-1, une liste non-exhaustive d'absorbants commerciaux à base de copolymères PS-DVB a été présentée.

Fontanals *et al.* (2005) ont étudié et comparé à partir des données de la bibliographie différents adsorbants à caractère hydrophile utilisés pour l'extraction de composés polaires dans des matrices aqueuses. Les supports Oasis HLB (200mg de phase et 30 µm de taille de particules) ont montré, par rapport à d'autres adsorbants (Bakerbond SDB-1, Isolute ENV+, Lichrolut EN, etc.), des rendements compris entre 83 % et 102% pour l'extraction simultanée de résidus de médicaments et d'œstrogènes. De plus, des méthodes de dosage des phtalates, antioxydants, stabilisants UV, alkylphenols et des œstrogènes (Liu *et al.*, 2004a; Beck *et al.*, 2006; Loos *et al.*, 2007; Sánchez-Avila *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011) ont été développées avec des cartouches Oasis HLB (Waters) pour la réalisation de l'extraction de ces composés dans des eaux. La versatilité de ces cartouches est due à leur double nature (polaire et apolaire), qui facilite la mise en contact avec les matrices aqueuses. Leurs applications sont multiples pour l'extraction des composés acides, neutres et basiques. Elles contiennent un copolymère macroporeux constitué de styrène divinylbenzène (DVB) et N-vinylpyroline (PVP). Il est stable dans une large gamme de pH (pH 1-14) et compatible avec de multiples solvants d'élution (Huck et Bonn, 2000). Ces multiples avantages signalés concernant les cartouches Oasis HLB (Waters) ont fait qu'elles ont été logiquement retenues pour notre protocole d'extraction SPE. Ce dernier est représenté sur la figure 3-5:

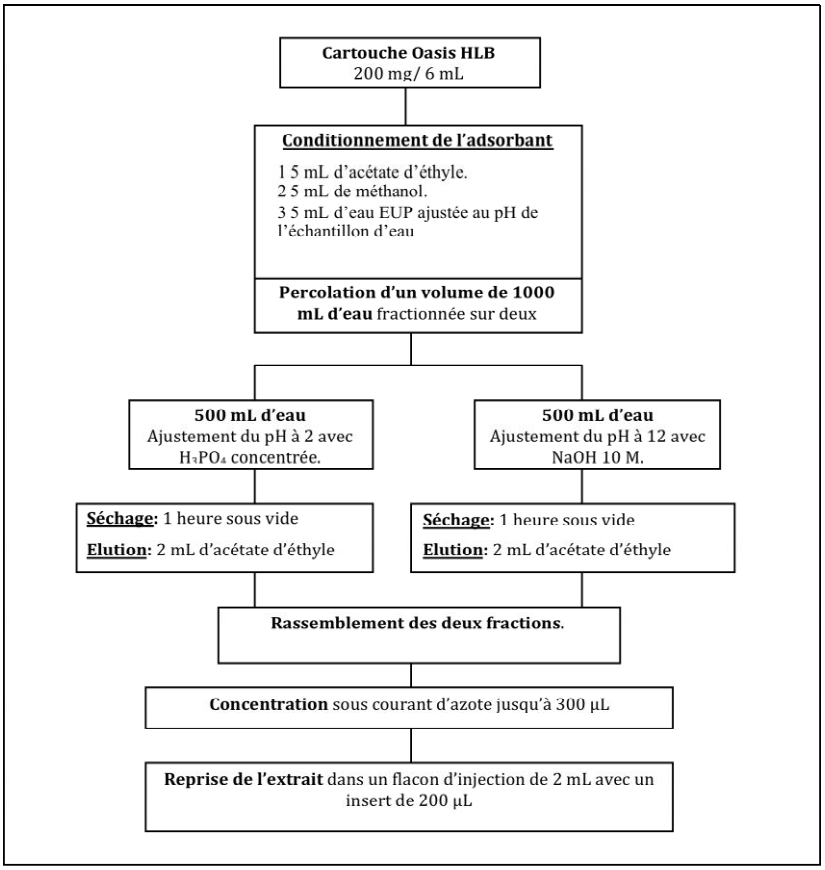


Figure 3-5: Schéma du protocole SPE

Les conditions opératoires ont été les suivantes:

L'ensemble de la verrerie et du matériel a été traité comme décrit dans le mode opératoire de l'extraction LLE (section 3.2.1).

1. **Rinçage des cartouches Oasis HLB:** Une fois les cartouches installées sur l'unité d'extraction, elles sont rincées avec 10 mL d'acétate d'éthyle et puis séchées sous vide pendant 30 min.

2. **Préparation des blancs dispositifs:** Comme pour l'extraction LLE, des blancs dispositifs sont réalisés, c'est à dire qu'on a vérifié préalablement l'absence de matières actives dans le dispositif d'extraction/concentration utilisé. Ce blanc est réalisé sur chaque poste d'extraction. Ces blancs consistent à faire passer 5 mL d'acétate d'éthyle sur la cartouche par fractions de 1 mL. Entre chaque dépôt de solvant, la cartouche est laissée sous vide pendant environ 1 minute. L'ensemble des fractions est collecté dans le même tube et traité comme tout éluat, c'est à dire évaporé puis injecté en GC-MS.

3. **Conditionnement des cartouches:** Comme indiqué dans le schéma 3-5, on fait d'abord passer 5 mL de méthanol, puis 5 mL d'acétate d'éthyle et finalement, 5 mL de l'eau ultrapure. Le pH de l'eau ultrapure est ajusté à pH acide ou basique en fonction du pH de l'échantillon à extraire.

4. **Dépôt des échantillons d'eau:** Via un tube en Téflon®, un volume de 500 mL d'échantillon, préalablement basifié ou acidifié, est percolé sur la cartouche. La vitesse de dépôt est d'environ 3 mL par minute. Dans le cas des échantillons d'eaux gazeuses, un dégazage préalable est nécessaire pour éviter un désamorçage du système pendant le dépôt. Ce dégazage est effectué à l'aide d'un bain ultrasons pendant 30 min à 1 heure en fonction du niveau de gazéification.

5. **Préparation d'un blanc d'eau ultrapure (EUP):** Dans chaque série d'échantillons, pour contrôler l'absence de contaminations lors de l'extraction SPE, un échantillon de 500 mL d'EUP subit le même traitement que les échantillons d'eau.

6. **Elution:** L'élution est réalisée avec 2 mL d'acétate d'éthyle en une fois. L'éluat est collecté dans des tubes en verre appropriés pour la concentration.

7. **Concentration:** L'éluat est placé dans un concentrateur TECHNE pour être évaporé sous courant d'azote jusqu'à un volume d'environ 200 µL. Ce concentré de chaque échantillon est alors transféré dans des tubes bruns munis d'un insert de 200 µL et fermés avec des bouchons recouverts de papier d'aluminium.

Les conditions chromatographiques sont présentées dans la section 3.2.3.

3.2.3 Analyse qualitative en GC-MS

Un chromatographe en phase gazeuse Varian GC 3800 avec un passeur Varian Combipal couplé à un spectromètre de masse Saturn 2200 à trappe ionique a été utilisé.

Un volume d'échantillon de 1 µL est injecté sur la colonne chromatographique apolaire 5% diphényle – diméthyle polisyloxane (Rxi-5MS, 30 m × 0,25 mm × 0,25µm) équipée d'une précolonne désactivée de 5 m × 0,53 mm. Le débit d'hélium est fixé à 1,0 mL/min.
La programmation en température du four a été établie selon Bouchonnet (2009), qui mentionne que dans les méthodes de « screening » pour la détection d'un nombre élevé de composés dans une seule analyse, l'utilisation d'une programmation de température allant de 40°C à 350°C est recommandée. La température finale a été cependant réduite à 280°C parce que la colonne ne pouvait pas supporter des températures plus élevées.

Les programmations de température du four et de l'injecteur PTV Varian 1079 sont présentées dans le tableau 3-2.

Tableau 3-2: Programmation de la température de l'injecteur PTV et du four

Programmation de l'injecteur			**Programmation du four**		
Température (°C)	*Pente (°C/min)*	*Temps de maintien (min)*	*Température (°C)*	*Pente (°C/min)*	*Temps de maintien (min)*
40°C	0	1 min	40°C	0	1 min
300°C	100°C/min	0	280°C	5°C/min	0
300°C	0	15 min	280°C	0	15 min

Comme indiqué auparavant, la source opère en impact électronique (EI) et l'acquisition des spectres se fait en mode « *Full Scan* » avec un balayage de 40 à 600 m/z. La température de l'interface est de 280°C, celle de la source de 220°C et celle de la trappe de 200°C.

3.3 SELECTION D'UN PANEL DE BOUTEILLES COMMERCIALES EN PET ET LES CONDITIONS D'EXPOSITION AU VIEILLISSEMENT ACCELERE

En raison de l'absence d'information concernant la liste des ingrédients entrant dans la composition de l'emballage, un panel varié de bouteilles a été choisi sur la base de critères morphologiques des bouteilles (la couleur, l'épaisseur et le volume) et des caractéristiques physico-chimiques de l'eau contenue (niveau de carbonatation, niveau de minéralisation). Le tableau 3-3 rassemble les informations sur ce panel de 10 bouteilles utilisé pour les essais de vieillissement accéléré. De plus, le taux de cristallinité des bouteilles PET et la nature chimique des bouchons ont été déterminés pour chacune des marques par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) (cf. chapitre 2).

Tableau 3-3: Panel des bouteilles utilisées pour les essais de vieillissement accéléré

Codification des bouteilles	Couleur de la bouteille	Volume de la bouteille (mL)	Type d'eau	Niveau de carbonatation (mg CO_2/L)	Minéralisation de l'eau (mg/L)
Marque A	Bleu clair	500	Eau minérale plate	-	890
Marque B	Vert foncé	500	Eau minérale gazeuse	6530	489
Marque C	Rouge	1000	Eau minérale gazeuse	3735	1199
Marque D	Bleu clair	1250	Eau minérale gazeuse	4650	4650
Marque E	Transparent	1250	Eau de source gazeuse	n.d	n.d. (faiblement minéralisée)
Marque F1	Transparent	500	Eau de source plate	-	n.d. (faiblement minéralisée)
Marque G	Bleu clair	1000	Eau minérale plate	-	2398
Marque H	Vert-bleu clair	1500	Eau minérale plate	-	n.d.
Marque I	Bleu clair	1000	Eau minérale plate	-	2640
Marque J	Bleu clair	1500	Eau de source plate	-	208

n.d.: valeur non déterminée. (les marques A et B sont les bouteilles étudiées ultérieurement dans ce travail).

Les bouteilles on été étuvées dans une chambre climatique BINDER modèle 720 KBF ICH équipée d'un système d'éclairage aux UVA. Les conditions d'exposition extrêmes des bouteilles ont été fixées à 65°C pendant 15 jours, équivalentes à un temps de contact en conditions normales entre 300 < $t \leq 700$ jours (Feigenbaum *et al.*, 2005). Simultanément, une dose de rayonnement UVA (1,7 W/m^2) a été appliquée pendant 9 heures aux bouteilles, afin de promouvoir la migration des molécules par exposition à la lumière. Le nombre de bouteilles ainsi exposées a été calculé en fonction du volume contenu, de façon à obtenir une prise d'essai suffisante pour conduire le protocole de «screening», soit au moins 1 000 mL.
Parallèlement, un lot identique de bouteilles n'a pas été soumis aux conditions d'exposition décrites ci-dessus. Il a été analysé suivant le même protocole analytique que les bouteilles ayant subi un vieillissement accéléré. Ce lot constitue un témoin (*t=0 jour*) représentatif du niveau d'une éventuelle contamination initiale de l'eau. Les analyses réalisées après vieillissement accéléré ont été nommées *t =15 jours*.

3.4 INTERPRETATION DES RESULTATS DE LA GC-MS

L'interprétation des chromatogrammes et des spectres de masse issus des échantillons d'eau extraites par LLE et SPE a été réalisée en tenant compte d'un certain nombre de données:

- Un blanc « colonne » est réalisé pour caractériser les molécules apportées par la colonne, comme celles de la famille des siloxanes.
- Plusieurs injections d'1 µl de solvant (acétate d'éthyle) ont été réalisées, d'une part pour rincer le système d'injection et d'autre part pour évaluer la contamination éventuelle de ce solvant.
- Les chromatogrammes obtenus pour l'eau ultrapure et les blancs dispositifs d'extraction (voir section 3.2.1 et 3.2.2) ont été aussi pris en compte.

Lorsque les pics des blancs et des échantillons avaient le même temps de rétention et le même spectre de masse, ceux-ci ont été intégrés. Si l'aire du pic des blancs était supérieure à celle des échantillons, alors la molécule n'a pas été considérée comme présente dans l'échantillon. Ensuite, les chromatogrammes des mêmes échantillons avec les mêmes procédures d'extraction à *t = 0 jour* et à *t = 15 jours* ont été comparés. La démarche a consisté en une superposition des deux chromatogrammes, en regardant pic par pic la coïncidence des temps de rétention, la résolution des pics et la coïncidence spectrale entre *t = 0 jour* et *t = 15 jours.*

Les spectres de masse obtenus pour chaque pic chromatographique sélectionné ont été soumis à une reconnaissance spectrale avec la bibliothèque des spectres NIST98 fournie avec l'instrument.

3.5 RESULTATS EXPERIMENTAUX

Pour chaque marque de bouteille en PET et pour chaque protocole d'extraction LLE et SPE, une large liste de molécules correspondant à des familles variées a été obtenue.

Les figures 3-6 et 3-7 montrent un exemple des chromatogrammes obtenus avec les deux protocoles d'extraction. Ils sont denses et nécessitent des interprétations minutieuses.

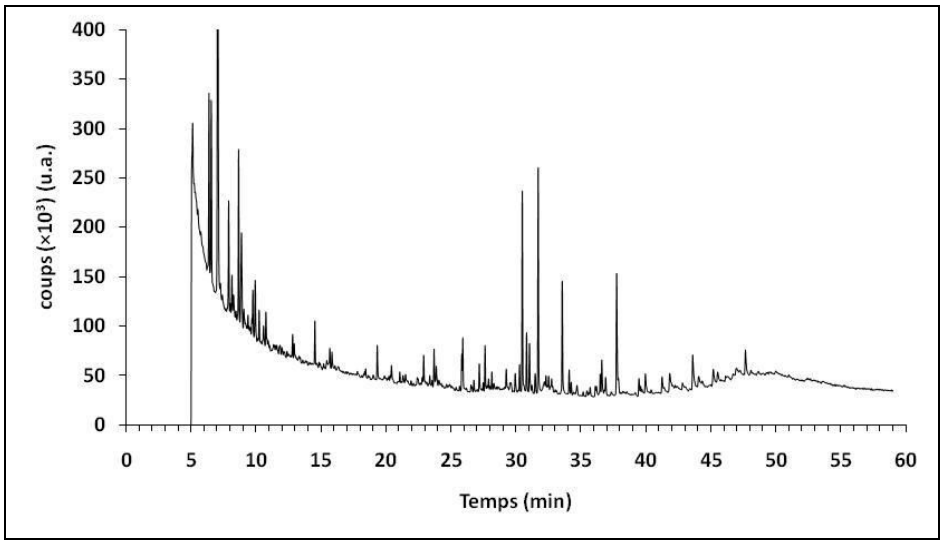


Figure 3-6: Chromatogramme correspondant à l'eau embouteillée plate de la marque A après 15 jours de vieillissement accéléré dans les conditions indiquées traitée par LLE et analysée par GC-MS

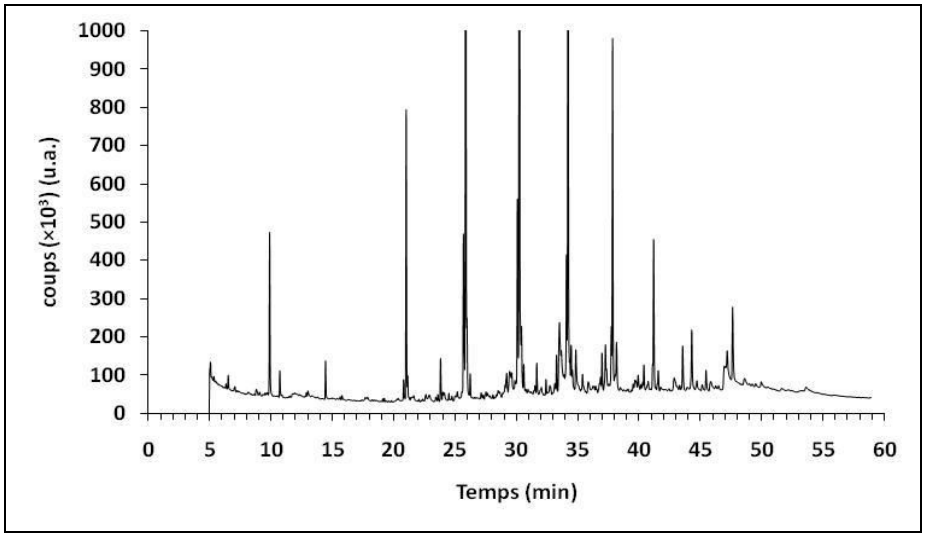


Figure 3-7: Chromatogramme correspondant à l'eau embouteillée plate de la marque A après 15 jours de vieillissement accéléré dans les conditions indiquées et traitée par SPE et analysée par GC-MS

Au cours de cette première partie de notre étude, l'identification des molécules a d'abord reposé sur une simple reconnaissance spectrale à partir de la bibliothèque fournie avec l'instrument. Cependant, cette méthodologie est très limitée et peu fiable. Le principal inconvénient des bibliothèques commerciales est qu'elles résultent de la compilation de données d'origines très variées et que tous les spectres n'ont pas été enregistrés de la même façon, notamment avec des modes ionisation différents non systématiquement mentionnés sur les spectres.

De plus, si une reconnaissance spectrale donne le meilleur accord possible avec la bibliothèque de l'instrument, il faut toujours confirmer les molécules avec leurs standards analytiques. Une molécule est considérée comme identifiée lorsqu'elle satisfait aux critères d'exactitude de son temps de rétention, ainsi qu'à ses ions caractéristiques et à leurs abondances relatives. Cette démarche obligatoire de confirmation implique donc de se procurer autant que possible les standards analytiques de chaque molécule recherchée.

Une confirmation des temps de rétention et du spectre de masse de certaines d'entre elles a été effectuée par injection d'une solution de standard pur en acétate d'éthyle. Cependant, les faibles niveaux de concentration, la présence d'interférences et d'effets matrices dues à l'eau et de possibles co-élutions n'ont pas toujours permis de confirmer clairement leur présence.

En outre, l'acquisition d'un nouvel instrument (Varian GC450 couplée à une MS 240) a compliqué la tâche. En effet, la comparaison directe des spectres acquis sur l'ancien instrument (GC3800-MS2200) pour les échantillons d'eau avec ceux acquis sur le nouvel instrument pour les standards en acétate d'éthyle s'est avérée difficile, voire impossible en raison de réglages totalement différents entre les deux instruments.

En respectant les critères établis dans la section 3.3, une liste de molécules a pu être établie. Les figures 3.8 et 3.9 présentent l'occurrence de détection de chaque substance (en nombre de bouteilles) à *t = 0 jour* et *t = 15 jours*, après extraction LLE et SPE, respectivement. Dans le tableau 3.4, les principales caractéristiques physico-chimiques de ces composés sont détaillées. Des éléments bibliographiques permettant d'établir l'origine probable de chaque substance y sont également donnés.

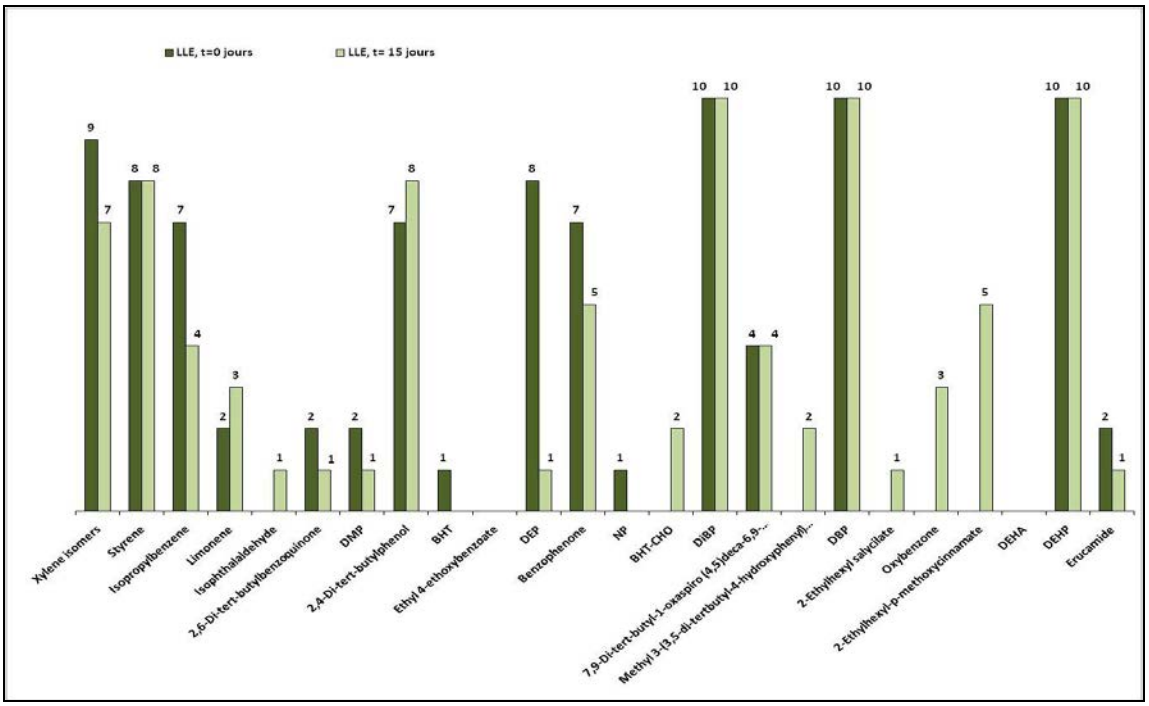


Figure 3-8: Nombre de bouteilles dans lesquelles ont été détectées chacune des molécules, listées dans le tableau 3-4, après extraction par LLE à *t = 0 jour* et *t = 15 jours*

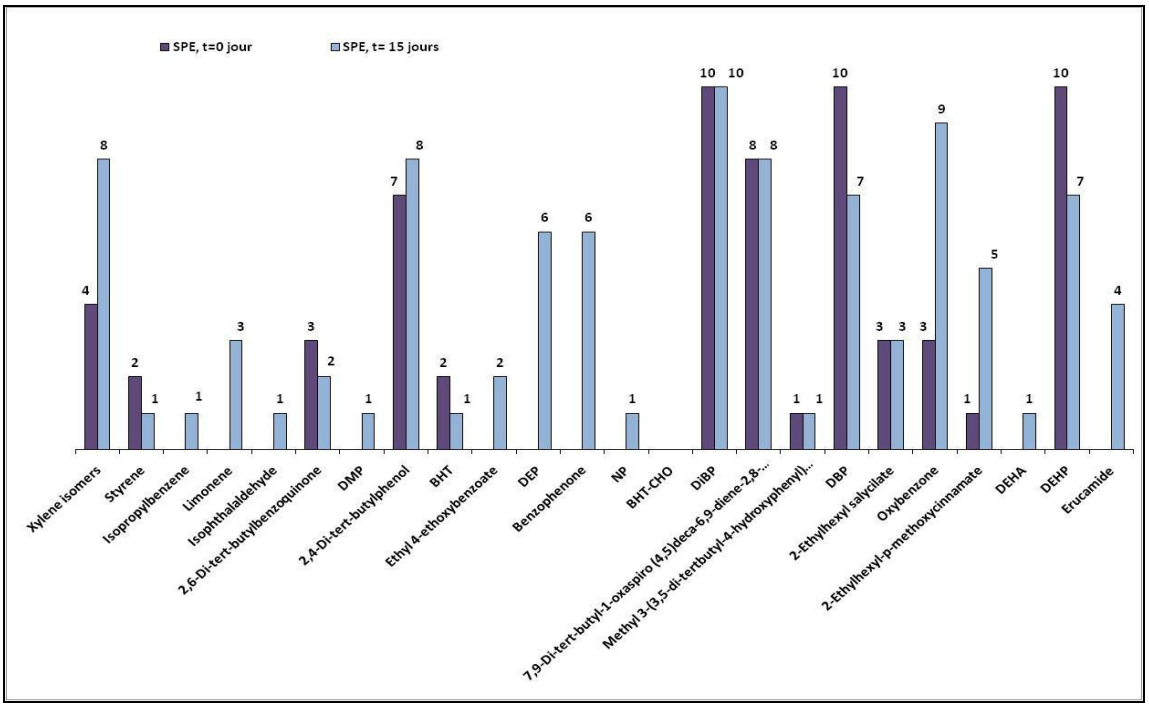


Figure 3-9: Nombre de bouteilles dans lesquelles ont été détectées chacune des molécules, listées dans le tableau 3-4, après extraction par SPE à *t = 0 jour* et *t = 15 jours*

Tableau 3-4: Liste de composés détectés dans les eaux embouteillées en PET après vieillissement accélérée des bouteilles (continue à la page suivante)

Temps de rétention	Substance identifiée	N°CAS	Formule	MM (g/mol)	Log K_{ow}	Origine	Matériau	Référence
6,406 min	*Ortho-, meta-, para-* xylène	95-47-6 108-38-3 106-42-3	C_8H_{10}	106,17	-	Sous-produits de polymérisation ou impuretés de la barrière en polyamide (PA) des bouteilles en PET multicouches	PET	(Franz et Welle, 2008)
7,118 min	Styrène	100-42-5	C_8H_8	104,15	-	-	PS	(O'Neill *et al.*, 1994)
7,990 min	Isopropylbenzène	98-82-8	C_8H_{12}	120,19	-	-	-	-
10,766 min	Limonène	138-86-3	$C_{10}H_{16}$	136,24	-	Arôme adsorbé dans le PET des bouteilles destinées aux boissons aromatisées.	PET recyclé	(Nerín *et al.*, 2003a)
17,037 min	Isophtalaldéhyde	626-19-7	$C_8H_6O_2$	134,13	-	Sous-produit de polymérisation ou impureté de la barrière en polyamide (PA) des bouteilles en PET multicouches	PET	(Franz et Welle, 2008)
22,454 min	Phtalate de diméthyle (DMP)*	131-1-3	$C_{10}H_{10}O_4$	194,20	1,6	Plastifiant	PET PVC	(Casajuana et Lacorte, 2003; Fankhauser-Noti et Grob, 2006; Montuori *et al.*, 2008)
22,849 min	2,6-Di-*tert*-butyl-benzoquinone*	719-22-2	$C_{14}H_{20}O_2$	220,31	4,4	Produit de dégradation des antioxydants type Irganox	PE	(Skjevrak *et al.*, 2003; Skjevrak *et al.*, 2005)
23,876 min	2,4-Di-*tert*-butylphénol*	96-76-4	$C_{14}H_{22}O$	206,33	5,2	Produit de dégradation des antioxydants type Irganox	PE, PP, PC, PET	(Nerín *et al.*, 2003b; Skjevrak *et al.*, 2003; Skjevrak *et al.*, 2005)
23,986 min	2,6-Di-*tert*-butyl-p-crésol (BHT)*	128-37-0	$C_{15}H_{24}O$	220,35	5,1	Antioxydants des matières plastiques	PE, PET	(Skjevrak *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2004; Tombesi *et al.*, 2004)
24,190 min	Ethyl-4-ethoxybenzoate*	23676-09-7	$C_{11}H_{14}O_3$	194,23	3,6	Réactif pour la production de PP et sous produit provenant des encres d'impression	PP	(Psillakis et Kalogerakis, 2003; Skjevrak *et al.*, 2005)
25,803 min	Phtalate de diéthyle (DEP)*	84-66-2	$C_{12}H_{14}O_4$	222,24	2,4	Plastifiant	PET PVC	(Casajuana et Lacorte, 2003; Fankhauser-Noti et Grob, 2006; Montuori *et al.*, 2008)
26,743 min	Benzophénone*	199-61-9	$C_{13}H_{10}O$	182,22	3,2	Stabilisant UV	PET recyclé	(Konkol, 2004)
28,479 min	4-Nonylphénol (NP)*	84852-15-3	$C_{15}H_{24}O$	220,30	5,9	Produits de dégradation des antioxydants	PET, PE	(Toyo'oka et Oshige, 2000; Loyo-Rosales *et al.*, 2004)

Temps de rétention	Substance identifiée	N°CAS	Formule	MM (g/mol)	Log K_{ow}	Origine	Matériau	Référence
29,718 min	3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldéhyde (BHT-CHO)*	1620-98-0	$C_{15}H_{22}O_2$	234,34	-	Produit de dégradation du BHT	-	(Fries et Pütman, 2002)
31,796 min	Phtalate de disobutyle (DiBP)*	84-69-5	$C_{16}H_{22}O_4$	278,40	4,1	Plastifiant	PET PVC	(Casajuana et Lacorte, 2003; Fankhauser-Noti et Grob, 2006; Montuori *et al.*, 2008)
32,774 min	7,9-Di-*tert*-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	82304-66-3	$C_{17}H_{24}O_3$	276,37	-	Produit de dégradation des antioxydants type Irganox et du BHT	PE/PET	(Skjevrak *et al.*, 2005) rapport bfr
33,267 min	Methyl-3-(3,5)-di-*tert*-4-hydroxyphenylpropionate	6386-38-5	$C_{18}H_{28}O_3$	292,20	-	Produit de dégradation des antioxydants type Irganox	PE/PET	(Brocca *et al.*, 2002) rapport bfr
33,641 min	Phtalate de butyle (DBP)*	84-74-2	$C_{16}H_{22}O_4$	278,34	-	Plastifiant	PET PVC	(Casajuana et Lacorte, 2003; Fankhauser-Noti et Grob, 2006; Montuori *et al.*, 2008)
34,894 min	Oxybenzone*	131-57-7	$C_{14}H_{12}O_3$	228,25	-	Stabilisant UV	-	-
37,540 min	2-Ethylhexyl salycilate*	118-60-5	$C_{15}H_{22}O_3$	250,34	-	Stabilisant UV	-	-
39,988 min	2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate*	5466-77-3	$C_{18}H_{26}O_3$	290,40	5,8	Stabilisant UV	-	-
41,279 min	Adipate de di-2-éthylhexyle (DEHA)*	103-23-1	$C_{24}H_{42}O_4$	370,57	6,1	Plastifiant	PVC	(Fankhauser-Noti et Grob, 2006)
43,666 min	Phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP)*	117-81-7	$C_{24}H_{38}O_4$	390,60	7,6	Plastifiant	PET PVC	(Casajuana et Lacorte, 2003; Fankhauser-Noti et Grob, 2006; Montuori *et al.*, 2008)
46,994 min	Érucamide	112-84-5	$C_{22}H_{43}NO$	337,58	-	Lubrifiant	PET	(Buiarelli *et al.*, 1993)

* Comparaison avec son standard analytique

.

Les composés détectés dans l'eau embouteillée en PET ont été classés en quatre groupes:

a) Des composés relatifs aux antioxydants

Avec les protocoles LLE et la SPE (cf. figures 3-9 et 3-10), le 2,4-di-*tert*-butyl phénol est le composé appartenant à ce groupe majoritairement détecté dans l'eau à *t = 0 jours* et *t = 15 jours*. Le 7,9-di-*tert*-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione apparaît dans 4 marques de bouteilles à *t = 0 jours* et à *t = 15 jours* pour la LLE. En SPE, cette substance est également identifiée dans 4 autres marques. Les autres substances (2,6-di-*tert*-butyl-p-benzoquinone, BHT, BHT-CHO, methyl 3-(3,5-di-*tert*-4-hydroxyphenyl) propionate et le 4-nonylphénol) sont spécifiques de 2-3 marques d'eau embouteillée en PET.

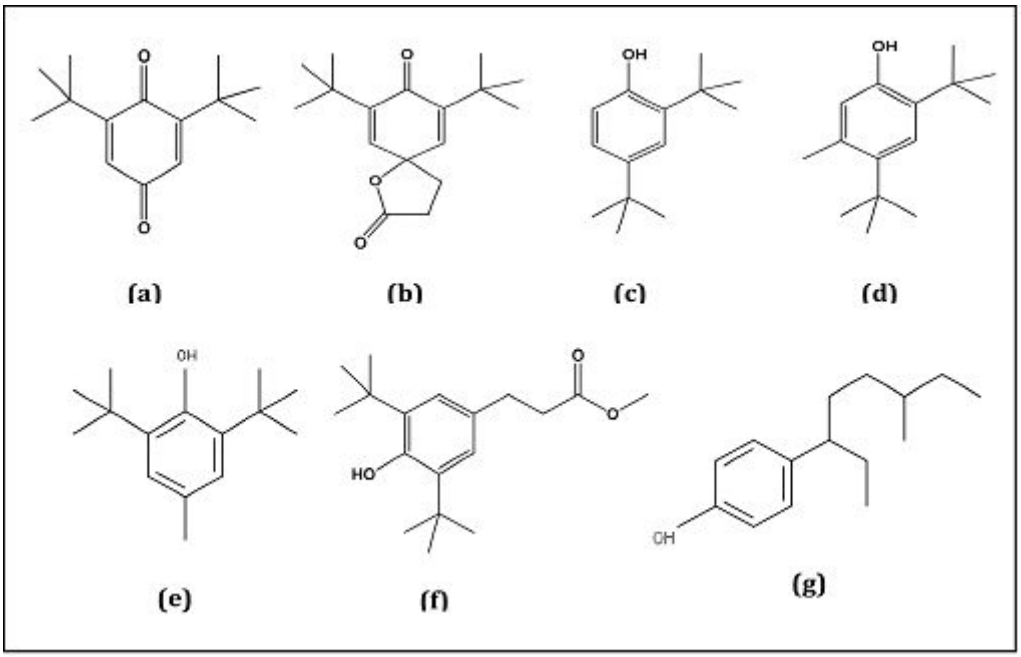


Figure 3-10: Structure chimique des composés relatifs aux antioxydants détectés dans l'eau embouteillée en PET: (a) 2,6-di-*tert*-butyl-benzoquinone, (b) 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione, (c) 2,4-di-*tert*-butylphénol, (d) 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldéhyde, (e) 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphénol (BHT), (f) methyl 3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) propionate, (g) 4-nonylphénol

Ces composés possèdent une structure commune (cf. figure 3-11) constituée d'un cycle phénolique substitué par des groupements *tert*-butyle en position 2 et 6 ou bien en position 2 et 4. Ces structures sont proches de celles d'antioxydants phénoliques type Irganox et Irgafos. Ces composés ont été détectés par plusieurs auteurs (Brocca *et al.*, 2002; Skjevrak *et al.*, 2003; Skjevrak *et al.*, 2005) dans l'eau au contact de canalisations et de flacons en polyéthylène (PE).

Brocca *et al.* (2002) proposent deux hypothèses pour expliquer la présence de ces composés: la première est que ces composés sont des produits de dégradation formés pendant la procédure d'extrusion des granulés. La deuxième est que ces molécules seraient des NIAS, c'est-à-dire des impuretés produites lors de la synthèse de l'additif utilisé.

Dans le cas des bouteilles en PET, leur présence reste difficilement explicable puisque ces antioxydants ne sont pas déclarés comme utilisés dans la fabrication du PET destiné au conditionnement de l'eau. Néanmoins, nos résultats sont confirmés par ceux récents d'une étude allemande. Ainsi, l'Institut fédéral pour l'évaluation des risques en Allemagne (BfR) *(BfR, 2011)* a rapporté la présence de methyl-3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) propionate, 2,4-di-*tert*-butylphénol et 7,9-di-*tert*-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione dans de l'eau embouteillée en PET. Selon leur rapport, le 2,4-di-*tert*-butylphénol est un produit de dégradation du tris(2,4-di-*tert*–butylphenyl)phosphite (Irgafos 168) et le 7,9-di-*tert*-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dien-2,8-dion est une produit de dégradation du BHT.

En ce qui concerne le 4-nonylphénol, celui-ci est généré par oxydation du tris(nonylphenyl) phosphite (TNPP) utilisé comme antioxydant dans certains polymères (PVC, PE) (McNeal *et al.*, 1999). Ce même composé a été identifié et classé par Franz et Welle (2008) comme NIAS provenant du matériau PET et des bouchons des bouteilles. Comme le montre la figure 3.9, il a été retrouvé dans l'eau gazeuse d'une seule marque de bouteille à *t = 15 jours.* Une particularité de cette marque de bouteilles est que l'emballage est constitué d'une couche en polyamide (PA). Ce polymère pourrait être à l'origine de la détection de 4-nonylphénol dans l'eau embouteillée.

b) Des composés relatifs aux stabilisants UV

En ce qui concerne le protocole LLE (cf. figure 3-8), c'est la benzophénone qui est le composé majoritairement détecté. Elle est présente dans 7 marques de bouteilles à *t = 0 jours* et dans 5 marques au bout de 15 jours. Par SPE (cf. figure 3-9), le nombre de composés détectés est plus important. Ainsi à *t = 15 jours*, en plus de la benzophénone, l'oxybenzone, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate et le 2-ethylhexyl salycilate sont détectés dans au moins 50 % des échantillons. Le 2-ethyl-4-ethoxybenzoate, seulement détecté par SPE, reste spécifique d'une marque commerciale.

Les structures chimiques de ces substances sont présentées dans la figure 3-11.

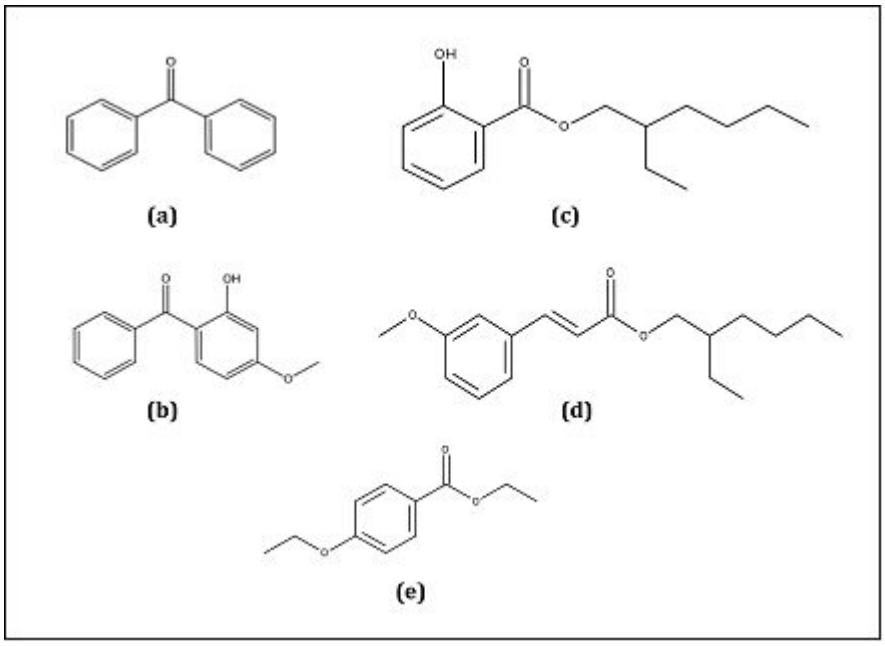


Figure 3-11: Structure chimique des stabilisants UV détectés dans l'eau embouteillée en PET: (a) benzophénone, (b) oxybenzone, (c) 2-ethylhexyl salycilate, (d) 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate, (e) ethyl-4-ethoxybenzoate

Ces stabilisants UV ne sont pas connus pour être utilisés pour la synthèse du PET destiné au conditionnement des eaux. Seules des nanoparticules à base de titane seraient employées dans ce but pour la fabrication de bouteilles en PET destinées au conditionnement de l'eau (cf. chapitre 1). Une des possibles explications à la présence de ces composés dans l'eau embouteillée peut être l'usage du PET recyclé. En effet, Konkol (2004) a identifié de la benzophénone et du méthyl salicylate (composé proche du 2-ethylhexyl salicylate) dans des flocons de PET recyclé. Ces substances n'étaient pas présentes dans le même PET vierge.

En ce qui concerne l'oxybenzone, le 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate et l'ethyl-4-ethoxybenzoate, aucune donnée bibliographique n'a signalé la présence de ces composés dans l'eau embouteillée ou le matériau PET.

c) Des composés relatifs aux plastifiants

Un certain nombre de composés appartenant à la famille des plastifiants (cf. figure 3-12) a été détecté dans l'eau embouteillée à *t = 0 jour* et *t = 15 jours*.

En ce qui concerne la LLE, le DBP, DiBP et DEHP ont été détectés dans l'eau des 10 marques de bouteilles avant et après vieillissement. La SPE a confirmé cette présence récurrente et généralisée à *t = 0 jour*, mais n'a pas confirmé de façon aussi évidente les résultats à *t = 15 jours*. Ainsi, au bout de 15 jours, seules 7 marques de bouteilles présentent des traces de DBP et DEHP. La détection du DMP reste minoritaire pour les deux protocoles d'extraction. Dans 7 marques de bouteille, une disparition du DEP a été observée au bout de 15 jours en LLE. En SPE, cette substance est au contraire apparue dans 6 marques au bout des 15 jours de vieillissement accéléré. Aucune explication n'a pu être formulée pour expliquer cette observation.

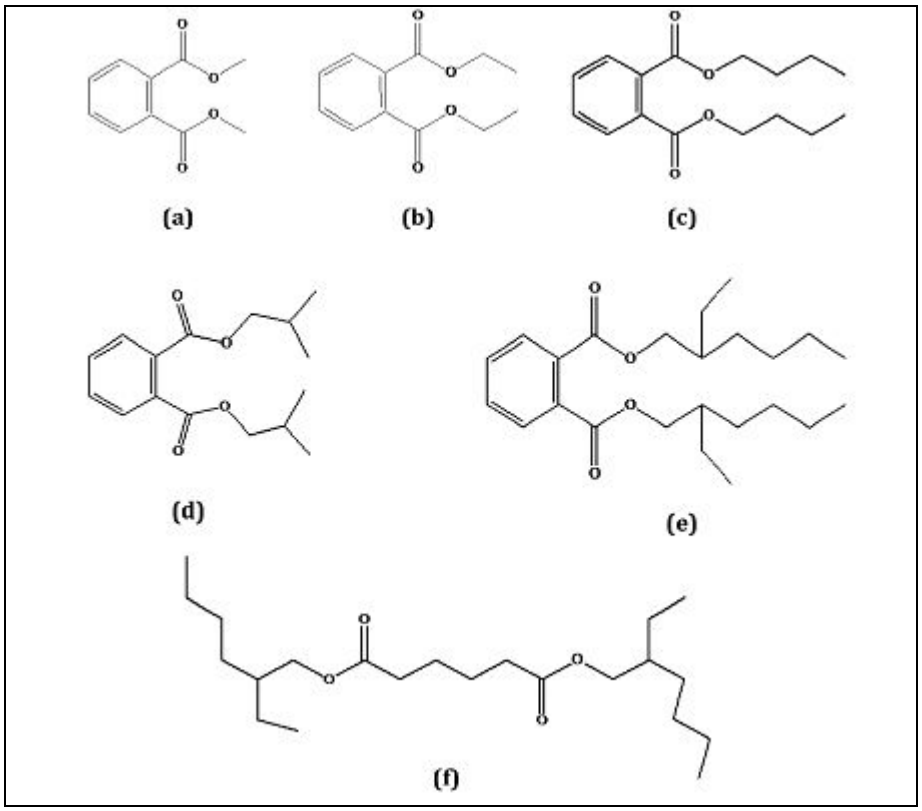


Figure 3-12: Structure chimique des plastifiants détectés dans l'eau embouteillée en PET: (a) phtalate de diméthyle (DMP), (b) phtalate de diéthyle (DEP), (c) phtalate de dibutyle (DBP), (d) phtalate de disobutyle (DIBP), (e) phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP) , (f) adipate de di-2-éthylhexyle (DEHA)

Plusieurs auteurs ont signalé la présence de plastifiants, notamment des phtalates dans l'environnement, les aliments et les boissons, ainsi que pour l'eau embouteillée en PET, avec des concentrations très variables suivant les études (Biscardi *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2006; Oehlmann *et al.*, 2008; Cao, 2010).

La principale problématique pour l'analyse de ces composés est qu'ils sont ubiquitaires. Fankhauser-Noti et Grob (2007) et Tienpont *et al.* (2005) ont suivi et évalué les pollutions dues aux phtalates (DBP et DEHP) dans toutes les étapes d'analyse. Ces auteurs ont affirmé que la principale voie de pollution est l'air et la verrerie du laboratoire. Les solvants utilisés se contamineraient au contact de l'air et des matériaux des instruments analytiques.

La GC-MS serait également une autre source de faux positifs. La phase mobile, l'injecteur PTV, le septum, les férules contiennent des phtalates. Plusieurs recommandations pour minimiser la présence de ces composés ont été mentionnées, dont le traitement de la verrerie à 400°C pendant 2h, la désactivation des surfaces de la verrerie avec du cyclohexane, le chauffage et le rinçage de l'injecteur avant l'analyse avec du solvant. De plus, David *et al.* (2003) ont rapporté qu'en LLE les risques de contaminations par des phtalates sont élevés en raison notamment de la nombreuse verrerie utilisée, de la grande quantité de solvant employée et d'un protocole opératoire en contact permanent avec l'atmosphère du laboratoire.

Les résultats de cette étude de «screening» ne reposent que sur l'analyse d'une seule bouteille par désignation commerciale, ce qui est certainement insuffisant pour tirer des conclusions individuelles. Mais même globalement, la présence presque systématique de phtalates reste difficilement interprétable au regard de leur non utilisation pour la synthèse du PET. Récemment, Guart *et al.* (2011) ont confirmé ce fait en analysant le matériau PET. Page et Lacroix (1995) ont affirmé que l'absence de plastifiants dans l'emballage n'implique pas forcément leur absence dans les aliments. Les étapes de traitement/préparation et de conditionnement des aliments pourraient être des étapes contaminantes. Par rapport aux résultats montrés dans la figure 3-8 en LLE, le DBP, DIBP et DEHP on été trouvés systématiquement dans toute les marques de bouteilles à $t = 0$ *jour* et $t = 15$ *jours*. Si on exclut la possibilité d'une contamination du dispositif d'extraction, les phtalates seraient déjà présents dans l'eau bien avant le conditionnement dans la bouteille en PET.

d) Des composés volatils

En LLE (cf. figure 3-8), c'est le xylène qui a été majoritairement détecté, sous ses trois formes isomériques, ainsi que l'isopropyl-benzène et le styrène. Ces substances ont été retrouvées à *t = 0 jour* et à *t = 15 jours*. Ces composés ont été moins fréquemment détectés avec le protocole SPE (cf. figure 3-9). Cette disparité peut s'expliquer par le fait que la SPE n'est pas particulièrement adaptée pour l'extraction des composés volatils.

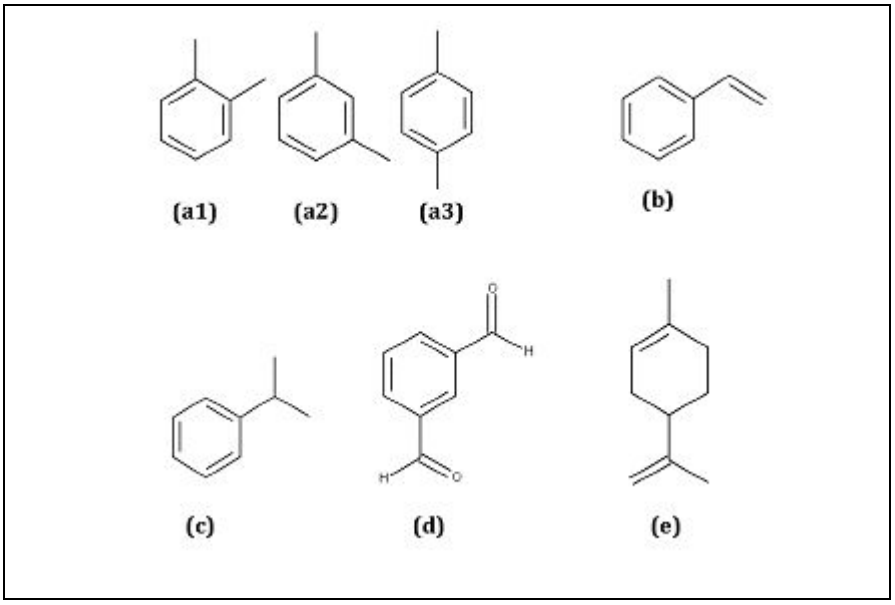


Figure 3-13: Structure chimique des composés volatils détectés dans l'eau embouteillée en PET: (a1) *orto*-xylène, (a2) *meta*-xylène, (a3) *para*-xylène, (b) styrène, (c) isopropylbenzène, (d) isophtaldéhyde, (e) limonène

Franz et Welle (2008) ont rattaché la présence des xylènes à des impuretés présentes dans les barrières en PA des bouteilles multicouches. Dans cette étude, seule une bouteille était constituée d'un tel matériau. La détection récurrente de ces substances au cours de cette première partie de notre étude alimente la possibilité de pollutions en provenance du solvant ou des dispositifs d'extraction.

Toujours selon ces auteurs, la présence d'isophtaldéhyde serait également liée à l'usage de matériau multicouche. Au cours de notre étude, cette substance a effectivement été détectée dans la seule marque utilisant ce type de matériau après 15 jours de vieillissement accéléré.

Selon Nerín *et al.* (2003a), la présence de limonène peut être expliquée par l'usage de PET recyclé. Cette substance est un arôme utilisé pour la fabrication de boissons aromatisées et peut être absorbée dans les parois du polymère.

e) Lubrifiants

Comme montré sur les figures 3-8 et 3-9, l'érucamide (cf. figure 3-14) a été détectée dans moins de 50 % des eaux embouteillées en PET. Buiarelli *et al.* (1993) et Monteiro *et al.* (1996) ont rapporté la présence de ce composé dans l'eau embouteillée.

Selon Shi *et al.* (2004), ce composé est utilisé pour la production des bouchons des bouteilles, afin de faciliter l'enlèvement de ceux-ci. Sa présence dans l'eau embouteillée pourrait donc s'expliquer par une migration à partir des bouchons. Un autre composé de la même famille, l'oléamide, a été détectée par le *BfR* dans des eaux embouteillées en PET.

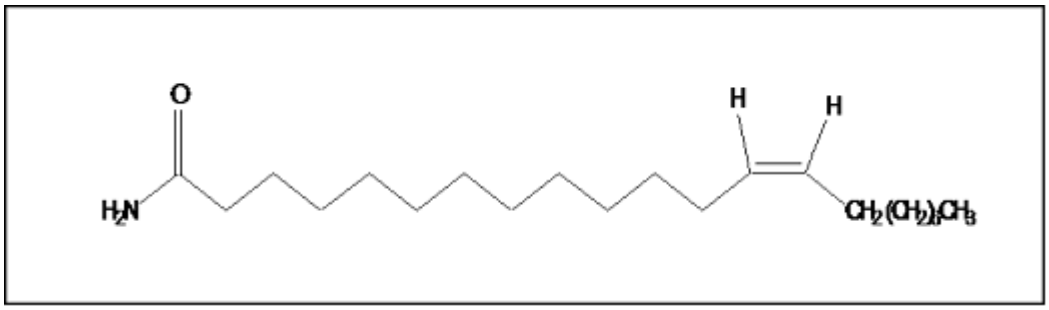


Figure 3-14: Structure chimique de l'érucamide

3.6 LA LISTE DE MIGRANTS POTENTIELS PRIS EN COMPTE DANS LA SUITE DE L'ETUDE

Sur la base des données bibliographiques et des résultats acquis lors de l'étape dite de «screening», une liste de substances d'intérêt pour la suite de l'étude a été établie (cf. tableau 3-5). A partir de cette liste, des outils analytiques spécifiques ont été développés afin de pouvoir quantifier et identifier ces substances au cours d'essais ultérieurs de migration.

Dans la prochaine section, la mise au point de ces méthodes de dosages des migrants potentiels dans l'eau et leurs performances seront présentées. Ces trois méthodes ont été utilisées pour apprécier les phénomènes de migration dans l'eau embouteillée en PET et en verre, après exposition solaire et exposition à la température.

Tableau 3-5: Liste de substances d'intérêts pour la suite de l'étude

Approche expérimentale	**Composés détectées étape « screening» :** - Phtalate de diméthyle (DMP) - 2,6-di-*tert*-butyl-p-benzoquinone - 2,6-di-*tert*-butyl-p-crésol (BHT) - 2,4-di-*tert*-butylphénol - Ethyl-4-ethoxybenzoate - Phtalate de diéthyle (DEP) - Benzophénone - 4-Nonylphénol - 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldéhyde - Phtalate de di-*iso*-butyle (DiBP) - Phtalate de butyle (DBP) - 2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate - Adipate de di-2-éthylhexyl (DEHA) - Phtalate de di-2-éthylhexyl (DEHP	**Méthode multi-résidus de dosage de 14 molécules dans l'eau par extraction en SPE et analyse en GC-MS.** Certains des molécules auparavant détectées dans l'étape « screening » (cf. tableau 3.3) n'ont pas été dosées pour des raisons analytiques (cf. section 3.7).
Approche bibliographique	**Aldéhydes:** - Formaldéhyde - Acétaldéhyde - Propanal - Butanal - Pentanal - Hexanal - Heptanal - Octanal - Nonanal - Décanal - Crotonaldéhyde	**Dosage de 11 aldéhydes dans l'eau par dérivation chimique puis extraction en SPE et analyse par HPLC-DAD** (cf. section 3.8).
	Éléments inorganiques: Fe, Li, Mn, Sr, Al, Ag, Sb, As, Ba, B, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, Zn, Sn, U, Be, Bi, Ce, Co, Gd, Ge, Rb, V, Zr, Ti.	**Dosage des éléments minéraux dans** l'eau par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (cf. 3.9)

3.7 LA METHODE MULTI-RESIDUS DE DOSAGE DE 14 MOLECULES DANS L'EAU PAR GC-MS

En utilisant la méthode dite de «screening » nous avons mis en évidence une liste de composés présentes dans l'eau embouteillée en PET (cf. tableau 3-5). Une méthode multi-résidus pour la quantification de certains de ces composés dans l'eau a été optimisée. Cette méthode d'analyse est basée sur l'extraction SPE et l'analyse par GC-MS.

La LLE est une méthode soumise à des risques élevés de contamination notamment par rapport aux phtalates, ce qui par conséquent entraîne une détérioration des limites de quantification de la méthode d'analyse. La LLE a aussi été abandonnée parce qu'elle ne présentait pas de plus-value évidente par rapport à la SPE en termes de spécificité. Dans le cas présent, les deux méthodes permettent d'extraire pratiquement les mêmes molécules.

Certaines des molécules initialement détectées (cf. tableau 3-4) dans l'eau embouteillée en PET, n'ont pas été dosées pour les raisons exposées ci-dessous:

- L'extraction SPE n'est pas adaptée pour la concentration des composés volatils (xylènes, styrène, isopropylbenzène, limonène, isophtaldéhyde). Des techniques d'extraction thermiques comme la SPME ou le « Headspace » sont plus appropriées pour la quantification de ces composés. De plus, ces composés sont détectés au début du chromatogramme et peuvent être co-élués avec le pic solvant qui n'est pas analysé par la MS.
- La séparation chromatographique de l'oxybenzone et 2-ethylhexyl salicylate avec la colonne Rxi5MS (apolaire) comporte une mauvaise résolution des pics avec un élargissement trop important de ceux-ci, empêchent son intégration. En effet, pour ces composés polaires, une dérivation par silylation avec le N-methy-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) serait plus adaptée à la séparation chromatographiques sur ce type de colonne (Negreira *et al.*, 2009). Une autre possibilité est la réalisation de l'analyse avec une colonne polaire type DB-Wax.
- Le dosage du 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione et du methyl-3-(3,5)-di-*tert*-4-hydroxyphenylpropionate n'a pas été réalisé en raison de l'impossibilité de se procurer des standards analytiques purs.

- En raison de co-élutions, le dosage de l'erucamide s'est avéré impossible avec la GC4400-MS240 (Varian). Les réglages différents (température de la source et de la trappe) n'ont pas permis de retrouver les conditions optimales obtenues avec l'instrument initialement utilisé pour l'analyse « screening » (GC3800-MS2200).

3.7.1 Conditions opératoires

Pour réduire au maximum les risques de contamination, des mesures particulières ont été prises. Des modifications significatives ont été apportées au protocole utilisé pour le « screening » (cf. section 3.2.2). Ce mode opératoire optimisé est détaillé dans les prochaines sections.

3.7.1.1 Prétraitement de la verrerie

La verrerie utilisée lors de l'analyse a été séchée à l'étuve pendant 12 h à 250°C. Une fois refroidie, elle a été rincée avec du cyclohexane, afin de désactiver les surfaces et éviter l'adsorption des phtalates, conformément aux recommandations de David *et al.* (2003). Une fois le solvant évaporé, la verrerie a été obturée au moyen des bouchons dédiés ou à l'aide de feuilles d'aluminium, puis stockée séparément du reste du matériel du laboratoire. Comme indiqué précédemment, les solvants ont été testés avant extraction/analyse et utilisé exclusivement pour cette méthode d'analyse. L'utilisation de matériel en plastique a été minimisée au maximum et l'emploi de matériel en Téflon® a été privilégié en raison de son inertie.

3.7.1.2 L'extraction en SPE

Les cartouches SPE Oasis HLB (200 mg/6cc) de chez Waters ont été employées, mais la phase absorbante a été conditionnée dans des tubes en verre, afin d'éliminer une possible contamination issue du matériau plastique plus couramment utilisé pour les cartouches SPE.

L'unité d'extraction sous vide, les étapes de rinçage et conditionnement des cartouches sont restées inchangées par rapport à celles décrites dans la section 3.2.2.

Le dépôt d'un volume de 1 000 mL d'eau dans les cartouches SPE a été réalisé au moyen de réservoirs en verre, conçus de façon à limiter au maximum les contacts avec l'atmosphère du laboratoire (cf. figure 3-15). Le transfert de l'eau du réservoir à la cartouche SPE a été réalisé au moyen de tubes en Téflon®. Comme précédemment, les échantillons d'eau gazeuse ont été dégazés avec un bain à ultrasons avant percolation sur la cartouche SPE, afin d'éviter un désamorçage du système d'extraction.

Figure 3-15: Dispositif d'extraction SPE

Trois étalons internes de recouvrement («surrogates»), le 2,6-di-*tert*-butyl-d_9-4-methylphénol-3,5-d_2, la benzophénone-2,3,4,5,6-d_5 et le phtalate de di-2-éthylhexyl - 3,4,5,6-d_4 ont été ajoutés aux échantillons d'eau avant extraction à une concentration située au milieu de la gamme d'étalonnage (cf. section 3.7.4).

Une fois la totalité de l'échantillon déposée, la cartouche a été séchée pendant 1 heure sous vide afin d'éliminer les traces résiduelles d'eau. Les analytes ont été élués avec 2 mL d'acétate d'éthyle. L'éluat a été transféré dans des flacons d'injection en verre brun et stocké au congélateur (-4°C) avant injection.

L'étape de concentration sous courant d'azote a été éliminée, après qu'une contamination des extraits par des phtalates (DiBP et DEHP) ait été mise en évidence au cours de cette étape.

3.7.1.3 Analyse par GC-MS

Un chromatographe en phase gazeuse Varian GC4400 avec un passeur COMBIPAL couplé à un spectromètre de masse MS240 avec source externe a été utilisé pour la séparation et l'identification des analytes. L'injection des extraits a été réalisée en Large Volume *(LVI : Large Volume Injection)* avec un volume d'injection de 4µL. La programmation de l'injecteur PTV 1079 (Varian), ainsi que le type de précolonne et colonne chromatographique utilisé sont identiques à ceux exposés dans la section 3.2.2.

Au niveau du système chromatographique, certaines mesures ont été prises afin de palier et/ou éviter les pollutions par des phtalates:

a) Avant l'injection des extraits:

- Rinçage de la seringue d'injection avec du cyclohexane.
- Chauffage de l'injecteur PTV à haute température pendant 1 heure (Fankhauser-Noti et Grob, 2007).
- Les flacons d'injection ont été obturés avec une feuille d'aluminium placée entre le tube et son bouchon pour éviter la contamination à partir du septum.

b) Durant l'injection des extraits:

- Au début de la séquence d'injection, 5 blancs solvants (acétate d'éthyle) sont injectés.
- A intervalles réguliers, plusieurs blancs solvant consécutifs sont injectés au milieu de la séquence pour éviter des «effets mémoire».
- Tous les 10 échantillons injectés, un point contrôle (solution de concentration connue contenant les 14 molécules dans l'acétate d'éthyle) a été analysé.

La programmation du four a été modifiée, afin d'optimiser la séparation chromatographique:

Tableau 3-6: Programmation de température du four pour la séparation chromatographique

Température (°C)	***Pente (°C/min)***	***Temps de maintien (min)***
40°C	0	1 min
280°C	8°C/min	0
280°C	0	15 min

Les conditions de la MS ont été les suivantes:

- Mode d'acquisition: *«Full Scan»*.
- Gamme de masse: 40 à 400 m/z.
- Débit d'hélium: 1,0 mL/min.
- *«Dumping gaz»*: 3 mL/min.
- *«Solvent delay»*: 15 min après injection.
- Température de la source: 220°C.
- Température de la trappe: 200°C.
- Température de l'interface: 280°C.
- Température du «manifold»: 50°C.

Les spectres de masse obtenus à partir des standards analytiques purs ont permis de sélectionner les ions utilisés pour le dosage et l'identification des 14 molécules et 3 étalons internes (cf. tableau 3.7).

Tableau 3-7: Molécules dosées par la présente méthode avec leurs fragments en masse

Composés		Ion de quantification (m/z)	Ions de confirmations (m/z)
1	Phtalate de diméthyle (DMP)	163	77
2	2,6-Di-*tert*-butyl-p-benzoquinone	177	220, 135
EI	2,6-Di-*tert*-butyl-d_9-4-methylphénol-3,5-d_2 (BHT-d_{11})	222	240
3	2,6-Di-*tert*-butyl-p-crésol (BHT)	205	220, 177
4	2,4-Di-*tert*-butylphénol	191	-
5	Ethyl-4-ethoxybenzoate	194	121, 166
6	Phtalate de diéthyle (DEP)	149	-
EI	Benzophénone-2,3,4,5,6-d_5	187	110, 82
7	Benzophénone	182	105, 77
8	4-Nonylphénol	135	121, 107
9	3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldéhyde (BHT-CHO)	219	191
10	Phtalate de di-*iso*-butyle (DiBP)	149	-
11	Phtalate de dibutyle (DBP)	149	-
12	2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate	178	161
13	Adipate de di-2-éthylhexyl (DEHA)	129	111
EI	Phtalate de di-2-éthylhexyl - 3,4,5,6-d_4 (DEHP-d_4)	153	171
14	Phtalate de di-2-éthylhexyl (DEHP)	149	167

3.7.2 La gamme d'étalonnage et les limites de quantification de la méthode

A partir des standards, une solution mère individuelle pour chaque molécule, étalon interne compris, a été préparée dans le méthanol à une concentration de 1000 µg/mL. Par dilution, une solution intermédiaire mixte à 30 mg/L pour le 2,4-di-*tert*-butylphénol et 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate et à 10 mg/L pour les autres composés et les étalons internes a été préparée dans l'acétate d'éthyle. Cette solution intermédiaire est utilisée pour la préparation dans l'acétate d'éthyle des 8 points de la gamme d'étalonnage.

Le domaine de la gamme d'étalonnage s'étend de 10 à 350 µg/L pour tous les composés, à l'exception du 2,4-di-tert-butylphenol et du 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate pour lesquels il est de 30 à 1000 µg/L. Les gammes d'étalonnage quadratiques pour les 14 molécules et les trois étalons deutérés sont présentées dans l'annexe 1.

Les limites de quantification de l'ensemble de molécules pour une prise d'essai de 1 000 mL ont été fixées en tenant compte du ratio signal/bruit et en tenant compte des valeurs des blancs d'extraction. Ces blancs d'extraction ont été réalisés avec de l'eau qualité LC. Une prise d'essai de 1 000 mL d'eau LC a été traitée de la même façon que les échantillons. De plus, pour chaque série d'échantillons deux blancs d'eau qualité LC ont été réalisés, afin de suivre ces contaminations au cours de chaque série d'analyse. Le DiBP, DBP et le DEHP sont présents de façon récurrente. Les moyennes des valeurs pour 32 mesures de DIBP, DBP et DEHP sont 0,02 µg/L, 0,01 µg/L et 0,02 µg/L, respectivement. Les limites de quantification de ces trois molécules ont été fixées de façon à ce que les valeurs des blancs ne dépassent pas 1/3 de LQ. Les LQ des molécules dosées par la présente méthode sont détaillées dans le tableau 3.8 de la section 3.7.3.

3.7.3 Les rendements d'extraction dans l'eau qualité LC

La détermination des rendements d'extraction (RST) a été effectuée pour deux niveaux de concentration: à LQ et une concentration au milieu de la gamme d'étalonnage dans une eau de qualité LC. La moyenne de RST pour chaque concentration avec l'écart type (EC) sont indiqués dans le tableau 3-8.

Pour la majorité des composés, les rendements d'extraction au niveau de la LQ et du milieu de gamme sont compris entre 56 % et 106 %. Cependant, pour le 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate, l'adipate de 2-éthylhexyl et le phtalate de 2-éthylhexyl, les rendements d'extraction sont moins performants (entre 35 et 46 %). Il a été décidé que les valeurs des concentrations de ces trois molécules dans les échantillons d'eau seraient corrigées par les rendements des dopages obtenus dans la même matrice.

Tableau 3-8: Moyenne de rendements d'extraction obtenue dans l'eau qualité LC

Composés	**Concentration à LQ (µg/L)**	**RDT (EC)** *n = 5*	**Concentration à milieu de gamme (µg/L)**	**RDT (EC)** *n = 11*
Phtalate de diméthyle (DMP)	0,1	107 % (12)	0,5	100 % (7)
2,6-Di-*tert*-butyl-p-benzoquinone	0,1	76 % (17)	0,5	65 % (11)
2,6-Di-*tert*-butyl-d_9-4-methylphénol-3,5-d_2 (BHT-d_{11})	0,1	57 % (6)	0,5	66 % (4)
2,6-Di-*tert*-butyl-p-crésol (BHT)	0,1	63 % (8)	0,5	73 % (12)
2,4-Di-*tert*-butylphénol	0,3	85 % (10)	1,6	81 % (4)
Ethyl-4-ethoxybenzoate	0,1	102 % (15)	0,5	97 % (10)
Phtalate de diéthyle (DEP)	0,1	114 % (13)	0,5	95 % (15)
Benzophénone-2,3,4,5,6-d_5	0,1	106 % (13)	0,5	103 % (9)
Benzophénone	0,1	99 % (10)	0,5	92 % (10)
3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldéhyde (BHT-CHO)	0,1	56 % (10)	0,5	65 % (13)
Phtalate de di-*iso*-butyl (DiBP)	0,1	93 % (11)	0,5	87 % (11)
4-Nonylphénol	0,1	85 % (16)	0,5	79 % (11)
Phtalate de dibutyle (DBP)	0,1	100% (13)	0,5	87 % (11)
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate	0,3	44 % (11)	1,6	35 % (6)
Adipate de 2-éthylhexyl (DEHA)	0,1	46 % (8)	0,5	41 % (5)
Phtalate de 2-éthylhexyl-3,4,5,6-d_4 (DEHP-d_4)	0,1	46 % (5)	0,5	38 % (7)
Phtalate de 2-éthylhexyl (DEHP)	0,1	60% (5)	0,5	40% (4)

RDT: Rendement d'extraction, EC: écart-type, n: nombre de réplicats.

3.7.4 Contrôles pour la validation de la série d'échantillons

- *Le contrôle intra-série:* il consiste en une solution de contrôle de concentration théorique à 200 µg/L dans l'acétate d'éthyle des 14 molécules et les 3 étalons internes. Cette solution est intercalée entre les séries d'échantillons, afin d'évaluer la justesse et la dérive de l'instrument d'analyse. La concentration expérimentale calculée ne doit pas s'écarter de 20 % de la valeur théorique, afin de valider la série.

- ***Les étalons internes de recouvrement («surrogate»)*:** comme indiqué, trois étalons internes (le 2,6-di-*tert*-butyl-d_9-4-methylphenol-3,5-d_2 , la benzophénone-2,3,4,5,6-d_5 et le phtalate de 2-éthylhexyl-3,4,5,6-d_4) ont été ajoutés aux échantillons d'eau par dilution appropriée d'une solution intermédiaire de ces 3 étalons déuterés à 10 mg/L dans le méthanol. La concentration théorique est de 0,4 µg/L dans l'eau. Ces étalons ont été utilisés pour contôler l'efficacité de l'extraction dans chaque échantillon analysé.

- ***Les dopages des échantillons*:** il permet de mettre en évidence un éventuel « effet matrice » au sein de l'échantillon analysé. Les effets matrices sont dus à la présence de substances interférentes dans l'échantillon, qui sont extraites en même temps que les analytes. Ces substances altèrent les performances de la méthode en diminuant ou en exaltant le signal des analytes. Pour détecter ce genre d'interférences, on réalise des dopages dans la matrice. Ces dopages consistent en l'addition d'une quantité connue des analytes dans l'échantillon soumis à l'analyse. Les rendements des dopages pour l'eau plate et l'eau gazeuse sont détaillés dans le tableau 3-9. Par comparaison entre les rendements obtenus avec de l'eau LC (cf. tableau 3-8) et ceux obtenus dans des eaux minérales dopées à des concentrations de l'ordre du milieu de gamme (cf. tableau 3-9), un effet matrice significatif est mis en évidence sur le dosage du BHT-CHO. Pour les autres composés, les rendements d'extraction ne sont pas altérés en présence d'eau minérale plate ou gazeuse, traduisant ainsi l'absence d'effet de matrice.

Tableau 3-9: Rendements des dopages dans l'eau plate et l'eau gazeuse

Composés	**Dopage (µg/L)**	**RDT (EC) dans l'eau plate *(n = 8)***	**RDT (EC) dans l'eau gazeuse *(n = 9)***
Phtalate de diméthyle (DMP)	0,4	100 % (9)	102 % (12)
2,6-Di-*tert*-butyl-p-benzoquinone	0,4	70 % (8)	74 % (22)
2,6-Di-*tert*-butyl-d_9-4-methylphénol-3,5-d_2 (BHT-d_{11})	0,4	78 % (13)	74 % (15)
2,6-Di-*tert*-butyl-p-crésol (BHT)	0,4	82 % (14)	80 % (13)
2,4-Di-*tert*-butylphénol	1,3	82 % (8)	82 % (15)
Ethyl-4-ethoxybenzoate	0,4	92 % (13)	99 % (11)
Phtalate de diéthyle (DEP)	0,4	107 % (17)	102 % (11)
Benzophénone-2,3,4,5,6-d_5	0,4	105 % (14)	100 % (15)
Benzophénone	0,4	92 % (12)	95 % (14)
3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyde (BHT-CHO)	**0,4**	**21 % (9)**	**29 % (11)**
Phtalate de di-*iso*-butyle (DiBP)	0,4	89 % (10)	89 % (11)
4-Nonylphénol	0,4	71 % (11)	75 % (15)
Phthalate de dibutyle (DBP)	0,4	85 % (10)	87 % (16)
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate	1,3	35 % (7)	42 % (12)
Adipate de 2-éthylhexyl (DEHA)	0,4	43 % (11)	52 % (11)
Phtalate de 2-éthylhexyl-3,4,5,6-d_4 (DEHP-d_4)	0,4	54 % (10)	50 % (9)
Phtalate de 2-éthylhexyl phthalate (DEHP)	0,4	60 % (8)	57 % (10)

RDT: Rendement d'extraction, EC: écart-type, n: nombre de réplicats.

3.8 LA METHODE DE DOSAGE DES COMPOSES CARBONYLES DANS L'EAU

Une méthode de quantification pour 11 composés carbonylés dans l'eau a été développée, afin de détecter et suivre leur présence au cours des essais de migration. Ces 11 composés carbonylés sont présentés dans le tableau 3-10. Les produits chimiques et le matériel sont détaillés dans l'annexe 2.

Tableau 3-10: Molécules dosées avec la présente méthode

Composés carbonylés	N°CAS	Formule brute	Masse molaire (g/mol)
Formaldéhyde	50-00-0	CH_2O	30
Acétaldéhyde	75-07-0	C_2H_4O	44
Propanal	123-38-6	C_3H_6O	58
Crotonaldéhyde	4170-30-3	C_4H_6O	70
Butanal	123-72-8	C_4H_8O	72
Pentanal	110-62-3	$C_5H_{10}O$	86
Hexanal	66-25-1	$C_6H_{12}O$	100
Heptanal	111-71-7	$C_7H_{14}O$	114
Octanal	124-13-0	$C_8H_{16}O$	128
Nonanal	124-19-6	$C_9H_{18}O$	142
Décanal	112-31-2	$C_{10}H_{20}O$	156

Les conditions opératoires pour cette méthode ont été optimisées en partant d'informations fournies par la méthode EPA 554 , Kieber et Mopper (1990), Zwiener *et al.* (2002) et Tsai *et al.* (2003). La méthode d'analyse consiste en la dérivation chimique des aldéhydes avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH), suivie d'une SPE. La séparation des molécules est réalisée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) avec un détecteur à barrettes de diodes (DAD).

Plusieurs essais préliminaires de dérivation et d'extraction SPE des aldéhydes dans l'eau ont été réalisés, afin de mettre au point la méthode d'analyse. Les résultats sont présentés dans les sections suivantes.

3.8.1 Optimisation de la dérivation chimique des aldéhydes

Une dérivation chimique consiste à modifier la structure des analytes, afin notamment de les rendre «visibles» par le système de détection de l'instrument d'analyse. Les aldéhydes ne possèdent pas de groupement chromophore dans l'ultraviolet. En faisant réagir l'hydrazine avec les aldéhydes en milieu acide (cf. figure 3-16), on forme des hydrazones, qui présentent une absorption maximale aux alentours de 360 nm (Vogel *et al.*, 2000).

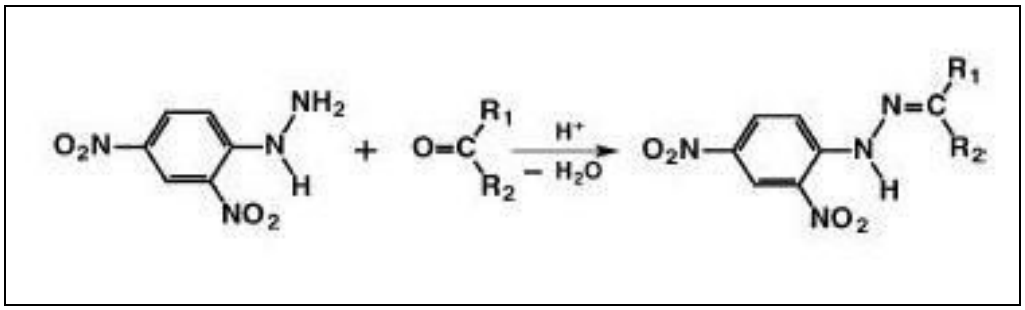


Figure 3-16: Réaction de dérivation des aldéhydes avec le 2,4-DNPH (Van Leeuwen *et al.*, 2004)

Plusieurs essais permettant de vérifier le taux de la réaction de dérivation ont été réalisés en faisant varier l'excès molaire en 2,4-DNPH en milieu acide. La température de réaction a été fixée à 55°C, comme proposé par Tsai *et al.* (2003) et le pH acide (pH = 3) a été maintenu en ajoutant dans le milieu réactionnel 4 mL d'une solution de tampon citrate 1 M (USEPA, 1992). Au préalable, la solution de 2,4-DNPH a été purifiée comme décrit par Zwiener *et al.* (2002). En effet, la contamination du DNPH par le formaldéhyde est un problème fréquent en raison de la présence très répandue de ce composé dans l'environnement. La solution de 2,4-DNPH purifiée a été injectée sur l'HPLC-DAD selon les conditions détaillées dans la section 3.8.3, afin de s'assurer qu'il n'y avait plus de formaldéhyde présent dans la solution de dérivation.

La réaction de dérivation a été suivie sur une durée totale de 8 heures avec une solution des 11 aldéhydes à 300 µg/L dans l'EUP, en faisant varier l'excès molaire de 2,4-DNPH (10, 50 et 100). Comme le montre la figure 3-17, un excès molaire à 50 de 2,4-DNPH et un temps de réaction de 4 heures ont été considérés comme les conditions optimales pour la détection des 11 aldéhydes.

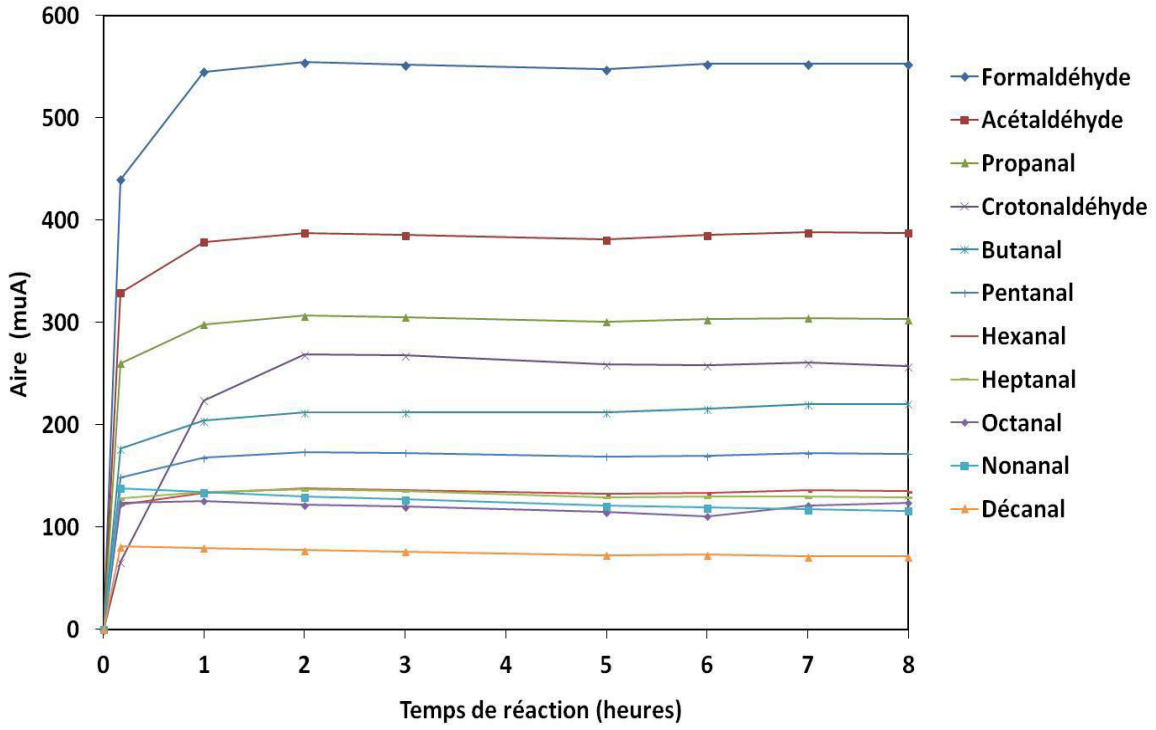


Figure 3-17: Suivi de la dérivation chimique des aldéhydes au cours du temps à 55°C avec un excès molaire de 2,4-DNPH (50 fois)

Ces conditions opératoires ont été retenues pour l'analyse des eaux embouteillées. Pour les échantillons d'eau gazeuse, la dérivation a été réalisée sans dégazage préalable de l'eau. Une fois la réaction achevée, le CO_2 du mélange de réaction a été éliminé aux ultrasons pendant 45 minutes, afin d'éviter un désamorçage ultérieur lors de la percolation de l'échantillon sur la cartouche d'extraction SPE.

3.8.2 Optimisation de la SPE des aldéhydes-DNPH

Dans le cadre du développement de l'étape d'extraction des aldéhydes-DNPH dans l'eau, deux types des supports ont été proposés dans la littérature: les cartouches Sep-Pak C18 (Kieber et Mopper, 1990; USEPA, 1992) et les Oasis HLB (Zwiener *et al.*, 2002). La structure chimique, les mécanismes de rétention de ces deux adsorbants, ainsi que les étapes conventionnelles de la SPE ont été détaillés dans la section 3.8.4.2 du présent chapitre.

Les rendements d'extraction au moyen de ces deux supports ont été évalués. La SPE a été réalisée manuellement à l'aide d'une unité d'extraction MACHEREY-NAGEL de 24 positions reliée à un système de vide. Chaque cartouche d'extraction est connectée à l'échantillon par un tube en Téflon®. La vitesse d'écoulement est réglée par des robinets connectés à chaque cartouche.

Le mode opératoire suivi pour la SPE est décrit dans la méthode EPA 554:

1. **Rinçage:** la cartouche d'extraction est rincée avec 10 mL d'acétonitrile (AcCN), puis séchée sous vide avant le conditionnement.
2. **Conditionnement de la cartouche:** il est réalisé par passages successifs de 10 ml (2 × 5 mL) d'AcCN et 10 mL (2× 5 mL) d'une solution de tampon citrate 1 M à pH =3.
3. **Chargement de l'échantillon:** un volume de 550 mL d'une solution à 3,6 µg/L des 11 aldéhydes-DNPH dans l'eau ultrapure acidifié à pH = 3 avec 10 mL de tampon citrate 1M est percolé à environ 5 mL/min. Cette solution a été préparée à partir d'un mélange commercial de 11 aldéhydes-DNPH en MeOH/AcCN (95 :5) fourni par TECHLAB.
4. **Séchage la cartouche:** pendant 5 min sous vide.
5. **Elution:** l'élution des analytes est réalisée avec 6 mL d'AcCN (2 × 3 mL), qui sont collectés dans des tubes en verre.

Puis, le volume de chaque éluat est ajusté à 7 mL avec de l'eau ultrapure. Les extraits sont stockés au réfrigérateur avant analyse dans des tubes en verre de 10 mL avec bouchon à vis. La surface interne des bouchons (au contact avec l'extrait) a été recouverte de papier aluminium pour éviter des contaminations. Les conditions de la séparation chromatographique par HPLC-DAD sont présentées dans la section 3.8.3. La figure 3-18 présente la moyenne des rendements d'extraction obtenus pour chaque cartouche sur 3 réplicats.

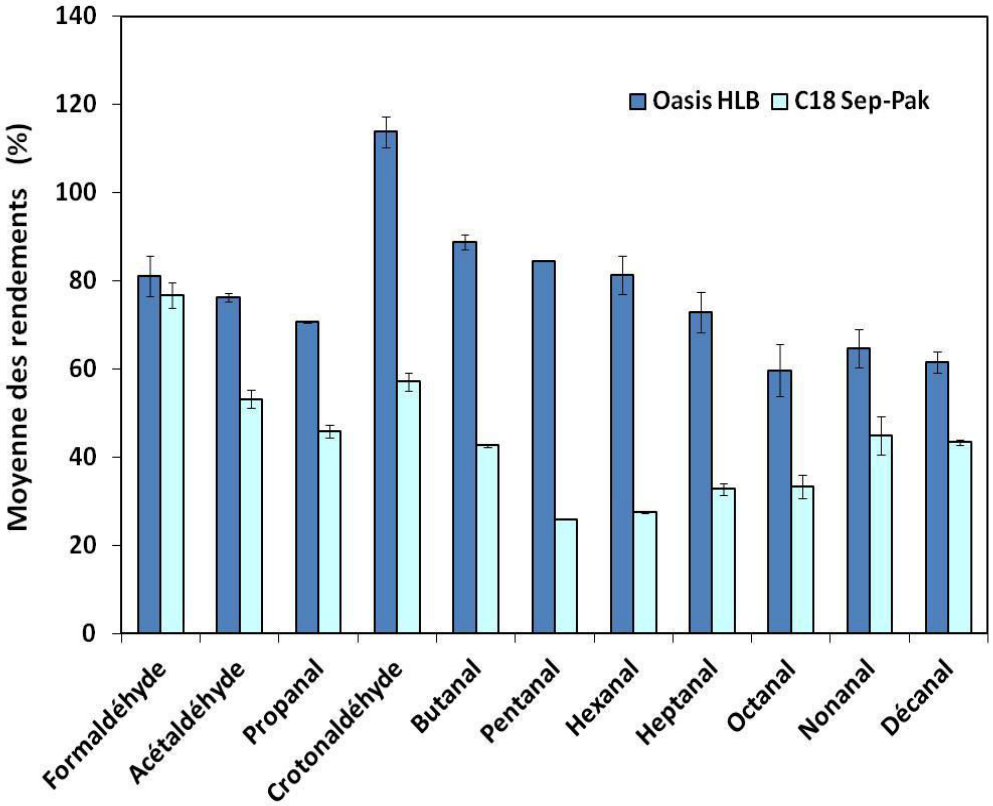


Figure 3-18: Moyenne des rendements d'extraction (n=3) obtenus avec les cartouches Oasis HLB et C18 Sep-Pak

La moyenne des rendements d'extraction des 11 aldéhydes-DNPH avec les cartouches Oasis HLB est comprise entre 60 % et 114 %. Les cartouches C18 donnent des rendements d'extraction plus faibles (de 33% à 77%).

Les essais réalisés montrent qu'on obtient donc de meilleurs rendements d'extraction avec les cartouches Oasis HLB qu'avec les cartouches C18. Selon la circulaire n°445 de la direction générale de la santé (DGS/SD7A, 2003), on considère qu'une méthode d'extraction est performante quand les rendements d'extraction sont compris entre 60 % et 120 % pour tous les composés. Par conséquent, les cartouches Oasis HLB avec le protocole d'extraction décrit auparavant ont été retenues pour le dosage des aldéhydes dans l'eau embouteillée.

Ce protocole manuel d'extraction a été transféré et validé sur un automate Gilson GX-274 ASPEC, permettant d'extraire rapidement et de façon reproductible un plus grand nombre d'échantillon.

3.8.3 Analyse par HPLC/DAD

Un chromatographe en phase liquide (HPLC) (Agilent 1100 Series) avec un détecteur à barrettes de diode (DAD) (Agilent 1200 Series) a été utilisé. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Sunfire C18 de chez Waters (4,6 mm × 250 mm, 5 mm de taille des particules).

La longueur d'onde d'absorption du détecteur DAD a été fixée à 360 nm pour la quantification des 11 aldéhydes.

Le gradient de solvant pour la séparation chromatographique est détaillé dans le tableau 3.11. Le débit constant est de 1,2 mL/min et le volume d'injection est de 80 µL. Un exemple de chromatogramme des 11 aldéhydes est montré dans l'annexe 3.

Tableau 3-11: Gradient d'élution pour la séparation chromatographique

Temps (min)	AcCN (%)	EUP (%)
0	60	40
20	60	40
35	90	10
50	90	10

3.8.4 Validation de la méthode d'analyse

La validation de la méthode a été réalisée selon la norme NF T90-210. Les tests appliqués ont été limités à la gamme d'étalonnage et aux limites de quantification.

3.8.4.1 Linéarité des 5 gammes extraites dans l'EUP

L'évaluation de la linéarité a consisté en la préparation d'une gamme d'étalonnage constitué de 5 points de gamme préparés sur 5 jours différents. Un mélange commercial des 11 aldéhydes à 1 mg/mL dans l'AcCN a été utilisé pour la préparation d'une solution intermédiaire à 50 mg/L (soit 250 µL du mélange commercial des 11 aldéhydes dans 5 mL d'AcCN). Chaque point de gamme est ensuite préparé par dilution de cette solution intermédiaire dans l'EUP. Puis, chaque point de gamme a été dérivé et extrait suivant la procédure décrite précédemment.

La démarche de validation a été identique pour les 11 aldéhydes. L'écart maximum acceptable (EMA) a été fixé à 20 % pour l'étalon situé à LQ et à 15 % pour les autres niveaux de concentration. A titre d'exemple seule la validation de l'étalonnage du formaldéhyde est présentée dans l'annexe 4. Les 5 points de gamme testés pour le formaldéhyde sont : 3,5, 5, 6, 8 et 10 µg/L. L'étalonnage linéaire a été validé pour les gammes de travail fournies dans le tableau 3-12.

3.8.4.2 Validation de la limite de quantification (LQ) dans l'EUP

En respectant le protocole de la NF T90-120, 5 solutions synthétiques ont été préparées à partir de l'EUP et dopées avec 11 aldéhydes aux niveaux de concentrations données dans le tableau 3-12. Ces échantillons synthétiques ont été analysés sur 5 jours différents à raison de 2 déterminations par jour.

Tableau 3-12: Domaine de la gamme d'étalonnage et limites de quantification de la méthode de dosage des 11 aldéhydes dans l'eau

Composés	Domaine de validité de la gamme d'étalonnage (µg/L)	Limite de quantification (LQ) validé (µg/L)
Formaldéhyde	3,5 – 10	3,5
Acétaldéhyde	2 – 10	2
Propanal	1,5 – 10	1,5
Crotonaldéhyde	1,5 – 10	1,5
Butanal	1,5 – 10	1,5
Pentanal	1,5 – 10	1,5
Hexanal	1,5 – 10	1,5
Heptanal	1,5 – 10	1,5
Octanal	2 – 10	2
Nonanal	3 – 10	3
Décanal	3 – 10	3

Après extraction et dérivation, les échantillons sont injectés deux fois dans le système HPLC-DAD. Dans l'annexe 5, seule la validation de la LQ du formaldéhyde est présentée, étant donné que la démarche est identique pour les 10 autres molécules.

3.8.4.3 Vérification de la validité de l'essai pour chaque série d'analyse

Pour chaque série d'échantillons, des vérifications complémentaires ont été effectuées afin de surveiller la validité et la qualité de l'essai. On distingue deux types de contrôles:

- ***Le contrôle intra-série:*** il s'agit d'un contrôle de justesse et de dérive au niveau de la méthode d'extraction et de l'instrument d'analyse. Une solution de contrôle est préparée à partir d'une solution intermédiaire à 50 mg/L dans l'AcCN selon le protocole décrit dans la section 3.6.4.1. La concentration théorique de cette solution est de 4 µg/L pour les 11 aldéhydes. Cette solution est préparée dans l'EUP lorsqu'il s'agit de contrôler une série d'échantillons d'eau plate et dans de l'eau gazeuse embouteillée en verre lorsqu'il s'agit de contrôler une série d'échantillons d'eau gazéifiée. Cette solution de contrôle est traitée de la même manière que les échantillons soumis à l'essai. Afin de valider la série analytique, l'écart entre la concentration expérimentale et la concentration théorique doit être inférieur ou égale à 20 %.

- ***Les dopages des échantillons:*** au cours de cette étude, un dopage à 4 µg/L sur l'ensemble des molécules est réalisé pour l'ensemble des échantillons. Les rendements d'extraction obtenues pour ce dopage sont déclarés conformes lorsqu'ils sont compris entre 60 % et 120 %. Un écart supérieur ou inférieur à ces valeurs est indicateur d'un effet matrice.

De plus, pour les échantillons d'eau gazeuse, l'étalonnage a été réalisé avec le même type d'eau embouteillée en verre, afin de s'affranchir d'un possible «effet matrice».

3.9 LA METHODE DE DOSAGE DES ELEMENTS INORGANIQUES DANS L'EAU

Cette méthode de dosage des éléments inorganiques dans l'eau est basée sur la norme NF EN ISO 17294 (partie 1 et 2) (ISO, 2003) et validée selon la norme NF T90-210. Le principe de la méthode repose sur le couplage entre 2 techniques : une torche à plasma (ICP) générant des cations monovalents, et un spectromètre de masse séparant ces cations en fonction du rapport m/z (masse/charge).

La mesure des éléments est directe dans l'eau acidifiée avec 1% d'acide nitrique à 69%. Cette méthodologie permet la quantification de 60 éléments inorganiques dans l'eau. Cependant, dans le présent travail, seuls les éléments les plus pertinents ont été pris en compte. Dans le tableau 3-13, ces éléments inorganiques sont indiqués avec les isotopes sélectionnés pour la quantification et les LQ de la méthode.

Tableau 3-13: Limites et isotopes de quantification des éléments inorganiques dosées avec la présente méthode

Élément	LQ (µg/L)	Isotope de quantification
Fe^{++}	1	56
Li^{+}	1	7
Mn^{++}	1	55
Sr^{++}	1	88
Al	1	27
Ag	1	107+109
Sb	0,2	121
As	1	75
Ba	1	138
B	1	11
Cd	1	114
Cr	1	52
Cu	1	63
Ni	1	58
Pb	0,1	206+207+208
Se	1	78
Zn	1	64
Sn	1	147
U	1	238
Be	1	9
Bi	1	209
Ce	1	140
Co	1	59
Gd	1	157
Ge	1	74
Rb	1	103
V	0,5	51
Zr	1	90
Ti	1	47

Chapitre 4: CINETIQUES DE MIGRATION DU PET VERS L'EAU

Dans le chapitre 3, une liste de migrants potentiels a été établie et des méthodes spécifiques pour le dosage de ces composés dans l'eau ont été développées. Dans le présent chapitre, l'évaluation de la migration de ces molécules (cf. tableau 3-5) du PET vers l'eau en fonction des différents facteurs externes et internes sera présentée.

Comme indiqué, les facteurs externes pris en compte pour cette étude sont:

- L'exposition solaire à température ordinaire à différents temps de contact.
- L'exposition à différentes températures pour un même temps de contact.

De plus, les résultats expérimentaux seront discutés par rapport à la typologie de l'eau (plate/gazeuse/eau ultrapure) et à la surface de contact de l'emballage polymérique.

Le choix des dénominations commerciales, les caractéristiques de l'eau et de l'emballage en PET pour les essais ont été présentés dans la section 1.8.5. Pour des raisons de temps, de place de stockage et du nombre limité de dénominations commerciales vendues à la fois en verre et en PET, seules deux marques ont été testées dans cette étude.

Au début de ce chapitre, le plan d'échantillonnage pour chaque expérience sera détaillé. Ensuite, les conditions expérimentales d'exposition à la température et d'exposition solaire seront décrites. Enfin, les résultats expérimentaux pour chaque famille de molécules (composés détectés par la méthode dite de «screening», aldéhydes et éléments inorganiques) seront présentés. Pour chaque famille de substances, les résultats de l'exposition à la température et ensuite ceux de l'exposition solaire seront exposés. Pour chaque type d'exposition, l'impact de la typologie de l'eau et de la surface de contact du polymère sur la migration sera discuté. Enfin une comparaison entre l'effet de la température et l'effet de l'irradiation solaire sera réalisée pour une même famille de composés.

A la fin du chapitre, la liste des substances retrouvées à l'issue des conditions d'exposition sera présentée.

4.1 DESCRIPTION DES ECHANTILLONS SOUMIS AUX ESSAIS DE MIGRATION

L'approvisionnement des échantillons a été réalisé dans le circuit de la grande distribution. L'absence de connaissances détaillées sur l'histoire de la bouteille (transport et stockage) avant son arrivée à notre laboratoire est un biais de l'étude. La détermination de la composition initiale de l'eau embouteillée avant le début de nos expériences (appelé *t = 0 jour*) s'est avérée indispensable pour connaître le niveau initial de composés chimiques issus de la migration entre l'embouteillage et l'arrivée au laboratoire. La figure 4-1 montre les échantillons testés pour chaque exposition.

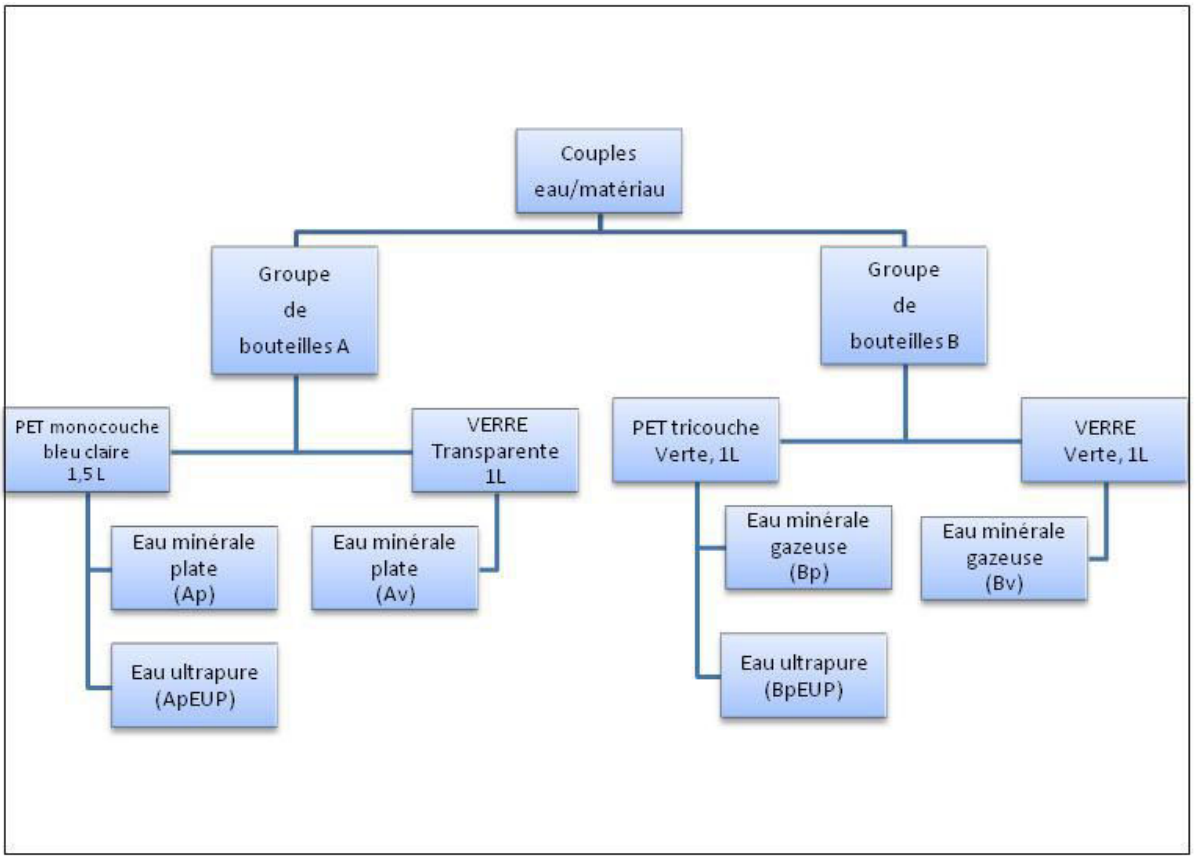


Figure 4-1: Schéma du groupe d'échantillons testés pour évaluer l'influence de l'exposition solaire et la température sur la migration

Pour estimer l'impact de la typologie de l'eau, l'eau minérale d'origine a été remplacée sur une partie des bouteilles du groupe A et B, par de l'eau ultrapure (EUP) comme simulant alimentaire pour la réalisation des essais de migration (dispositions de la directive 85/572/CEE encore en vigueur au démarrage de nos essais). L'utilisation de l'eau ultrapure avec une composition connue et contrôlée permet également de préciser l'origine des composés éventuellement retrouvés aux termes de l'essai.

4.2 CONDITIONS D'EXPOSITION A LA TEMPERATURE DE L'EAU EMBOUTEILLEE

L'exposition des bouteilles a été réalisée dans des étuves BINDER modèle M240 et modèle BD115. La température de l'eau a été suivie au cours de l'exposition avec un thermo-capteur d'Oceasoft placé dans l'eau EUP embouteillée en PET pour chaque série d'échantillons. Les bouteilles PET/verre des marques A et B (cf. figure 4-1) ont été exposées à plusieurs températures, afin d'évaluer l'effet thermique sur la diffusion des substances du polymère vers l'eau. Les conditions d'expositions ont été les suivantes:

Tableau 4-1: Conditions d'exposition à la température des bouteilles en PET et en verre des marques A et B

	Temps d'exposition	**Température d'exposition**
Série 1 (Bouteilles A + B)	10 jours	40°C
Série 2 (Bouteilles A + B)	10 jours	50°C
Série 3 (Bouteilles A + B)	10 jours	60°C

La première exposition de 10 jours à 40°C a été fixée à partir des dispositions de la directive 82/711/CE (encore en vigueur au début des essais de migration). Ces conditions de contact sont établies pour la réalisation des essais de migration pour des matériaux en matière plastique qui dans leur usage courant auront une durée de contact avec l'aliment supérieure à 24h.

Deux autres températures d'exposition (50°C et 60°C), plus proches de la température de transition vitreuse (*Tg*) du PET ont été sélectionnées. La *Tg* du PET peut varier entre 75°C à 100°C en fonction du taux de cristallinité du polymère (Etienne et David, 2002). Une évolution de la matière se produit quand un polymère est soumis à des températures proches à *Tg* ce qui a une influence directe sur la migration des molécules. Dans le chapitre 2, la détermination de la *Tg* et les effets de relaxation structurale ont été étudiés pour les bouteilles en PET testées dans cette étude.

Par ailleurs, il a été constaté au moyen de la spectrométrie mécanique à basse fréquence que la phase amorphe du polymère n'était pas dans un état stable après la fabrication des bouteilles PET. Lorsque le matériau PET est chauffé, une évolution de celui-ci est montrée dès 40°C, ce qui est susceptible d'influencer la migration des molécules. De plus, un autre phénomène associé à la transition vitreuse de la phase cristalline a été observé. Une chute drastique du module élastique entre 60°C et 70°C montre une accélération de la dynamique des mouvements des chaînes macromoléculaire dans la phase amorphe (Bach *et al.*, 2011).

4.3 CONDITIONS D'EXPOSITION A LA LUMIERE SOLAIRE DE L'EAU EMBOUTEILLEE

L'exposition à la lumière directe du soleil des bouteilles en PET a été effectuée pendant les mois de juillet et août 2010 à la station de vieillissement naturel de Bandol (83). Les groupes de bouteilles A et B (cf. figure 4-1) on été exposés à 45 degrés face au sud (cf. figure 4-2), selon les prescriptions de la norme ISO 877 : 2009. Cette norme établit les dispositions pour le choix et l'utilisation des méthodes d'exposition des plastiques au rayonnement solaire.

Figure 4-2: Exposition solaire des bouteilles des marques A et B en PET et verre à la station de vieillissement naturel de Bandol (83)

Les conditions d'exposition des bouteilles sont exposées dans le tableau 4-2:

Tableau 4-2: Conditions d'exposition à la lumière des bouteilles en PET et verre

	Temps d'exposition	**Irradiation totale**	**Période d'exposition**
Série 1 (Bouteilles A + B)	2 jours	47,43 MJ/m^2	du 27/07 au 29/07
Série 2 (Bouteilles A + B)	6 jours	119,79 MJ/m^2	du 30/07 au 04/08
Série 3 (Bouteilles A + B)	10 jours	237,90 MJ/m^2	du 26/07 au 04/08

MJ: megajoules.

La température de l'eau a été suivie au cours du transport ainsi que pendant l'exposition solaire au moyen de capteurs de température Thermo-Tracer d'Oceasoft placés dans l'eau EUP embouteillée en PET pour les deux groupes de bouteilles et pour chaque temps d'exposition. Dans le tableau 4-3 sont exposées les températures maximales, minimales et moyennes atteintes par l'eau EUP dans les bouteilles A et B en PET au cours du transport et de l'exposition solaire. A titre d'exemple, la figure 4.3 montre le profil de température pour les bouteilles A irradiées pendant 10 jours (Série 3).

Tableau 4-3: Suivi des températures de l'eau EUP dans les bouteilles en PET au cours du transport et de l'exposition solaire

	Température (°C)					
	Bouteilles A			**Bouteilles B**		
	Moy.	*Min.*	*Max.*	*Moy.*	*Min.*	*Max.*
Série 1 *(2 jours)*	25,3	16,5	42,5	*	*	*
Série 2 *(6 jours)*	26,3	17,0	43,5	27,4	16,5	45,5
Série 3 *(10 jours)*	27,6	16,5	45,5	*	*	*

(*) Mesures non exploitables

Comme le montre la figure 4-3, la température de l'eau a été enregistrée du 19/07/2010 au 13/08/2010. Cette période comprend les temps de transport des échantillons sur le site de Bandol, d'exposition solaire pour une durée maximale de 10 jours et le retour des bouteilles au laboratoire d'hydrologie de Nancy. Les échantillons ont été stockés en chambre froide (5 ± 3°C) à l'abri de la lumière avant la réalisation des analyses de l'eau.

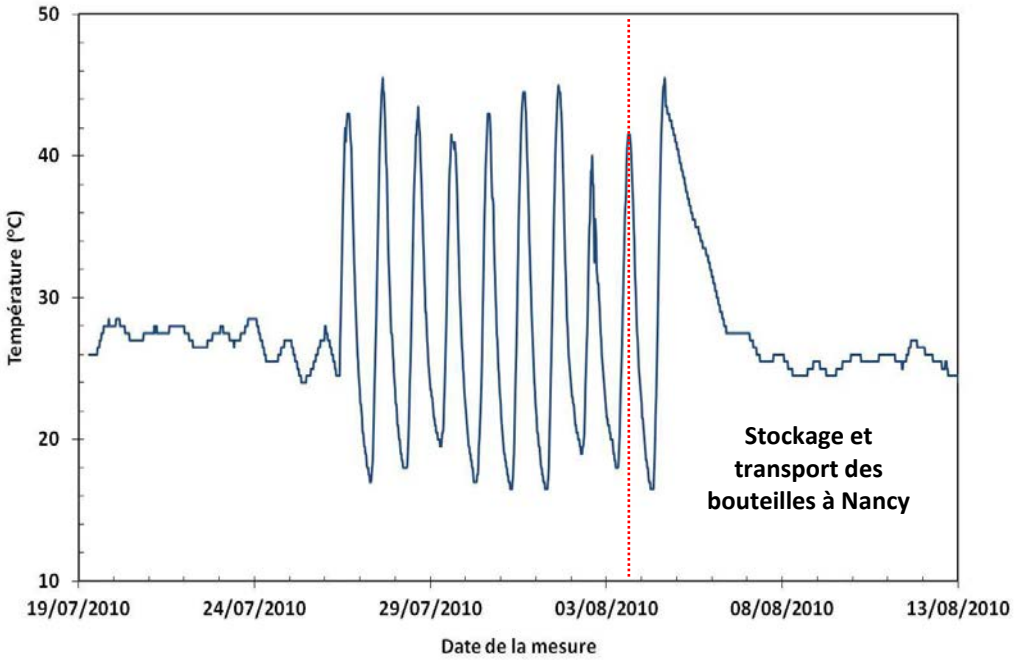


Figure 4-3: Profil de températures de l'EUP dans la bouteille en PET de la marque A

La dégradation du matériau PET après l'irradiation maximale (237,9 MJ/m^2) a été évaluée au moyen de l'IRTF-ATR dans le chapitre 2 du présent travail. Cependant, aucune dégradation oxydative sur les bandes caractéristiques du PET n'a été observée dans les conditions de notre étude.

4.4 RESULTATS EXPERIMENTAUX SUR LA MIGRATION DES MOLECULES DETECTEES PAR LA METHODE DITE «SCREENING» DANS L'EAU EMBOUTEILLEE

L'impact de la lumière solaire et de la température sur l'eau embouteillée en PET et en verre a été évalué, au moyen de la méthode multi-résidus dite de «screening». La liste des 14 molécules ainsi recherchées avec leurs LQ a été présentée dans le tableau 3-8 (cf. chapitre 3). Dans une première approche, seules les eaux embouteillées qui ont subi les conditions maximales d'exposition (10 jours d'exposition solaire avec une irradiation totale de 237,9 MJ/m^2 ou 10 jours à 60°C) ont été analysées. Cette première approche repose sur l'hypothèse que dans ces conditions, la migration serait plus importante en raison d'une température proche à la *Tg* du PET.

Pour ces conditions extrêmes d'exposition, seul le 2,4-di-*tert*-butylphénol a été trouvé dans l'eau embouteillée en verre et en PET, aussi bien pour les bouteilles de la marque A et celles de la marque B. Les concentrations dans l'eau des autres molécules (DMP, 2,6-di-*tert*-butyl-p-benzoquinone, BHT, ethyl-4-ethoxybenzoate, DEP, benzophénone, 4-nonylphénol, 3,4-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldéhyde, DiBP, DBP, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate, DEHA et DEHP), auparavant détectées lors de l'analyse qualitative, se sont avérées inférieures à la LQ de la méthode d'analyse.

4.4.1 Impact de la température

Les concentrations de 2,4-di-*tert*-butylphénol détectées dans à *t = 0 jour* et à *t = 10 jours* après exposition à 60°C pour l'eau minérale plate, gazeuse et l'eau ultrapure dans les bouteilles de la marque A et B en PET et verre sont représentées dans la figure 4-4 et 4-5.

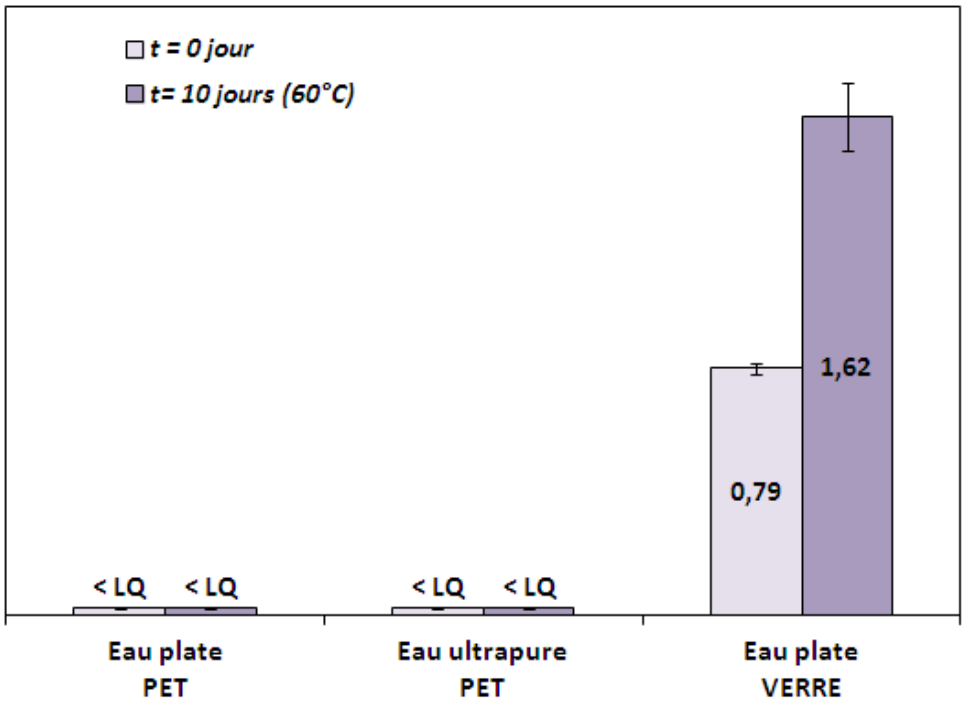


Figure 4-4: Concentrations de 2,4-di-*tert*-butylphénol (µg/L) dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure conditionnées dans des bouteilles PET et verre de la marque A. Les concentrations représentées sont la moyenne de 5 et 4 réplicats pour l'eau plate et l'eau ultrapure, respectivement. La limite de quantification (LQ) pour le 2,4-di-*tert*-butylphénol est 0,3 µg/L

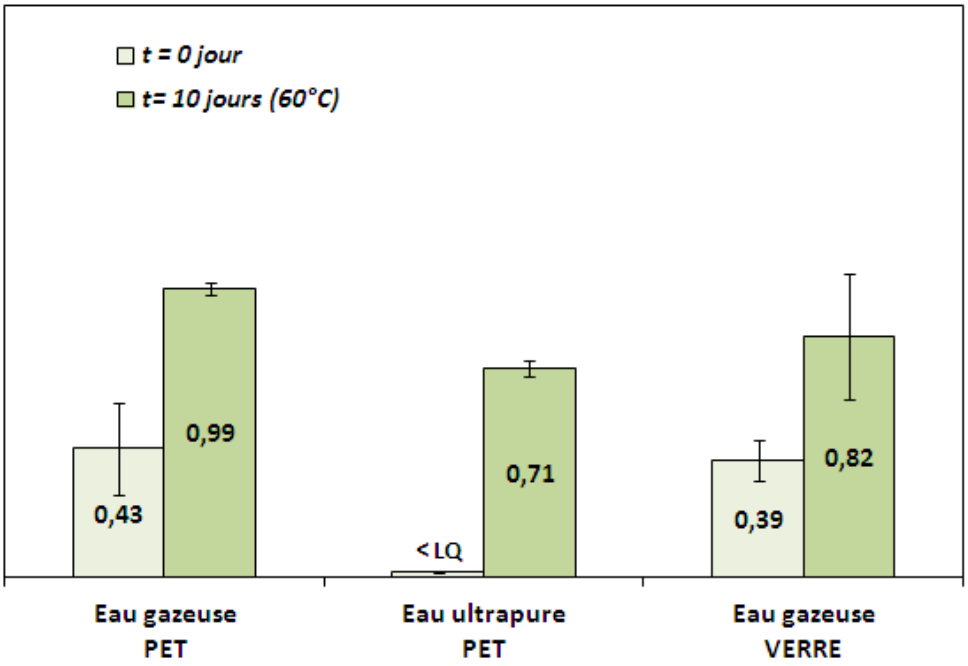


Figure 4-5: Concentrations de 2,4-di-tert-butylphénol (µg/L) dans l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure conditionnées dans des bouteilles PET et verre de la marque B. Les concentrations représentées sont la moyenne de 5 et 4 réplicats pour l'eau plate et l'eau ultrapure, respectivement. La limite de quantification (LQ) pour le 2,4-di-tert-butylphénol est 0,3 µg/L

Sur la figure 4-4, seule l'eau plate conditionnée en verre présente des traces de 2,4-di-*tert*-butylphénol. Ce composé est présent à 0,8 µg/L dans l'eau à *t = 0 jour* et la concentration est doublée après exposition à 60°C au bout de 10 jours. Sur la figure 4-5, l'eau gazeuse pour les deux types de conditionnement (PET et verre) présentent la même teneur de 2,4-di-*tert*-butylphénol (environ 0,4 µg/L) avant exposition (*t = 0 jour)*. Une augmentation jusqu'à 0,9 µg/L dans l'eau gazeuse a été observée après 10 jours d'exposition à 60°C pour les deux types de conditionnements. La présence de 2,4-di-*tert*-butylphénol dans l'eau ultrapure conditionnée en PET à *t = 10 jours* confirme que l'origine de ce composé est liée au matériau de conditionnement. Cependant, la présence de ce même composé dans l'eau embouteillée en verre fait suspecter que l'origine de cette substance puisse être aussi liée au matériau des bouchons de la bouteille.

L'identification de la composition des bouchons a été réalisée au moyen d'une mesure calorimétrique (cf. chapitre 2). Les bouteilles de la marque A et B sont obturées avec des bouchons en polyéthylène (PE). Plusieurs auteurs (Brocca *et al.*, 2002; Skjevrak *et al.*, 2003; Skjevrak *et al.*, 2005) ont auparavant détecté le 2,4-di-*tert*-butylphénol dans l'eau au contact avec de canalisations et des flacons en polyéthylène haute densité (PEHD). Les bouchons des bouteilles en verre sont constitués d'un bouchon en aluminium avec un joint en matière plastique. Selon *The International Life Science Institute* (ILSI, 2003), des antioxydants de type phénoliques et phosphites sont ajoutés pendant la fabrication de certains polymères, comme le polyéthylène, afin d'éviter la dégradation oxydative du polymère. Brocca *et al.* (2002) ont rapporté que le 2,4-di-*tert*-butylphénol était un possible produit de dégradation de ces antioxydants. Le 2,4-di-*tert*-butylphénol a été trouvé par *l'Institut fédéral pour l'évaluation des risques en Allemagne (BfR, 2011)* dans des eaux embouteillées mais la quantification de ce composé n'a pas été réalisée.

4.4.2 Impact de l'exposition solaire

Contrairement à la température, les concentrations de 2,4-di-*tert*-butylphénol dans les bouteilles exposées à la lumière directe du soleil se sont avérées non quantifiables. L'eau plate dans les bouteilles en verre de la marque A, l'eau gazeuse conditionnée en PET et verre de la marque B et l'eau ultrapure dans la même bouteille B ont présenté des traces de ce composé situées entre la limite de détection de la méthode (0,1 µg/L) et la LQ. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces observations: la première est que l'exposition solaire n'a aucun effet sur la migration de ce composé et la seconde est que le 2,4- di-*tert*-butylphénol se dégradaderait sous l'action de la lumière solaire.

4.5 RESULTATS EXPERIMENTAUX SUR LA MIGRATION DES ALDEHYDES DANS L'EAU EMBOUTEILLEE

Le dosage des 11 aldéhydes (formaldéhyde, acétaldéhyde, propanal, butanal, crotonaldéhyde, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal et décanal) dans l'eau embouteillée a été réalisé par dérivation chimique, suivi d'une extraction en SPE et analyse par HPLC-DAD (cf. section 3.8). Le test de Dixon a été appliqué aux résultats obtenus pour chaque série d'échantillons, afin d'écarter des possibles valeurs aberrantes.

Seuls le formaldéhyde et l'acétaldéhyde ont été détectés dans l'eau embouteillée en PET des deux marques (A et B). L'absence de ces composés dans l'eau conditionnée en verre au cours des deux types d'exposition confirme que l'occurrence de formaldéhyde et acétaldéhyde est liée au matériau PET. Plusieurs auteurs ont signalé que ces deux substances sont générées par dégradation thermique et oxydative du matériau PET (Kovarskaya *et al.*, 1968; Lorusso *et al.*, 1985; Romão *et al.*, 2009b).

Les résultats expérimentaux de migration du PET vers l'eau pour le formaldéhyde et l'acétaldéhyde au cours de l'exposition solaire sont présentés dans les prochaines sections.

4.5.1 Impact de la température

- **Eau minérale plate**

Les concentrations de formaldéhyde et acétaldéhyde détectées pour l'eau minérale plate et l'eau ultrapure dans les bouteilles de la marque A en fonction des différentes températures au bout de 10 jours d'exposition sont présentées dans les figures 4.6 et 4.7.

La moyenne des concentrations a été calculée à partir de 5 réplicats pour l'eau plate et à partir de 4 réplicats pour l'eau ultrapure. La température de 20°C correspond à la température de stockage des bouteilles entre leur conditionnement et l'ouverture pour analyse. Dans le cas de l'eau minérale, la concentration obtenue à cette température donne le niveau de migration atteint entre l'embouteillage et l'ouverture pour l'analyse [temps de contact moyen d'une année]. Dans le cas de l'eau ultrapure, cette teneur correspond au niveau initial de ces deux molécules dans le simulant (temps de contact avec le PET pratiquement négligeable).

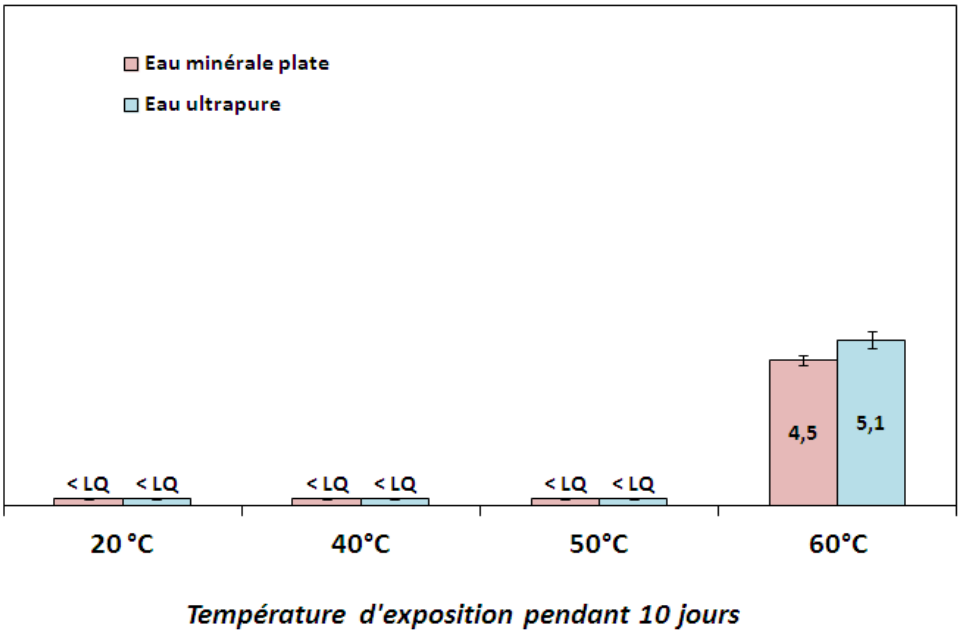


Figure 4-6: Concentrations de formaldéhyde (µg/L) dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure conditionnée dans des bouteilles en PET de la marque A exposées pendant 10 jours à différentes températures. La limite de quantification (LQ) de la méthode est 3,5 µg/L

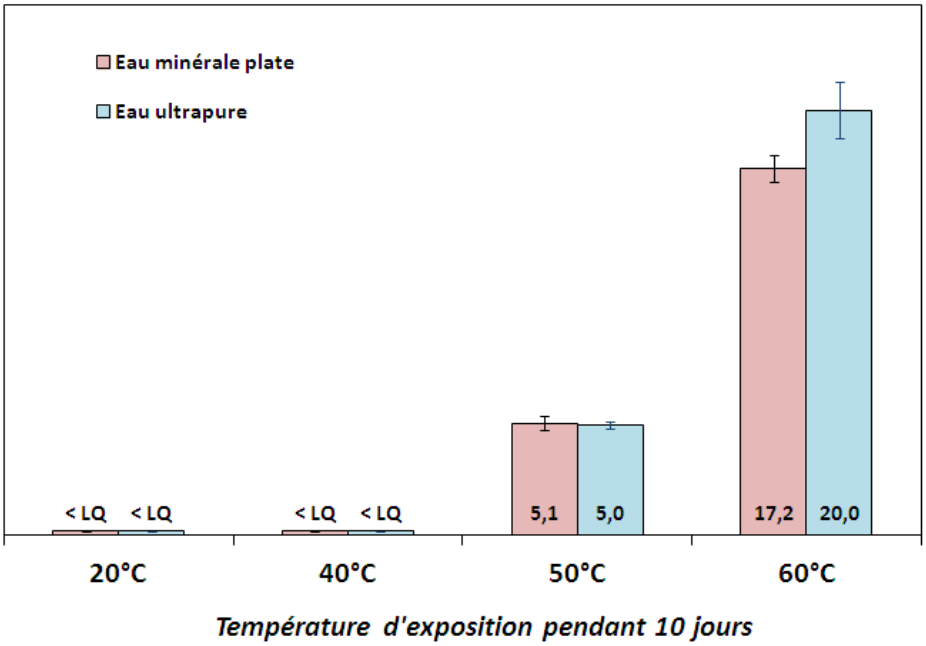


Figure 4-7: Concentrations d'acétaldéhyde (µg/L) dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure conditionnée dans des bouteilles en PET de la marque A exposées pendant 10 jours à différentes températures. La limite de quantification (LQ) de la méthode est 2 µg/L

La figure 4-6 montre que les teneurs de formaldéhyde dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure sont inférieures à la LQ (< 3,5 µg/L) de la méthode d'analyse après 10 jours d'exposition des bouteilles PET à 40°C et 50°C. L'apparition du formaldéhyde dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure n'est observée qu'après 10 jours d'exposition à 60°C.

Sur la figure 4-7, on observe que la présence d'acétaldéhyde est détectée après 10 jours d'exposition dès 50°C dans l'eau plate et l'eau ultrapure. Une augmentation significative de la teneur d'acétaldéhyde dans les deux types d'eau est observée à 60°C.

Par rapport à la littérature, les résultats de la migration de l'acétaldéhyde dans l'eau minérale plate au bout de 10 jours à 40°C de cette étude concordent avec ceux présentés par Ceretti *et al.* (2010). Ces auteurs ont rapporté que les concentrations de ce composé restent inférieures à 2 µg/L dans l'eau plate dans les mêmes conditions d'exposition. Par contre pour le formaldéhyde, à notre connaissance, aucune autre étude de migration dans les mêmes conditions d'exposition n'a été auparavant rapportée. Pour les autres études concernant la migration du formaldéhyde et l'acétaldéhyde, l'inter-comparaison s'avère difficile en raison des conditions de migration très différentes.

De manière générale, les concentrations trouvées pour le formaldéhyde et l'acétaldéhyde dans l'eau plate et l'eau ultrapure sont pratiquement les mêmes. Par conséquent, la migration de ces deux molécules sous l'effet de la température n'est pas influencée par la physico-chimique de l'eau. De ce fait, l'utilisation de l'EUP comme simulant alimentaire préconisé pour la directive 2002/72/CE pour la réalisation des essais de migration reproduit de façon identique la migration dans l'eau plate d'origine. Dans les conditions maximales d'expositions 10 jours à 60°C, les teneurs des deux composés ne dépassent pas les seuils établis dans la toute récente réglementation européenne (EU, 2011) de 15 mg/kg pour le formaldéhyde et de 6 mg/kg pour l'acétaldéhyde.

- **Eau minérale gazeuse**

Les concentrations de formaldéhyde et acétaldéhyde détectées pour l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure dans les bouteilles de la marque B en fonction de différentes températures après 10 jours d'exposition sont présentées dans les figures 4-8 et 4-9. La température de 20°C correspond à la température de stockage des bouteilles entre leur conditionnement et l'ouverture pour analyse [temps de contact de 11 mois]. Dans le cas de l'eau ultrapure, la valeur indiquée à cette température correspond à la teneur de ces deux molécules avant remplissage des bouteilles. La moyenne de concentrations a été calculée à partir de 5 réplicats pour l'eau gazeuse et à partir de 4 réplicats pour l'eau ultrapure.

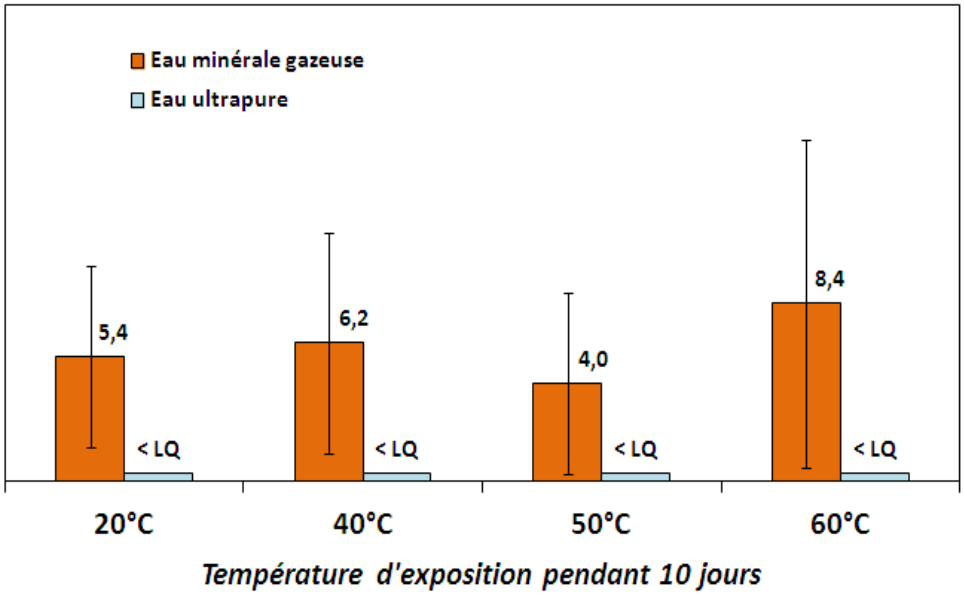


Figure 4-8: Concentrations du formaldéhyde (µg/L) dans l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure conditionnée dans des bouteilles en PET de la marque B après 10 jours d'exposition à différentes températures

Aucun effet de la température sur la migration du formaldéhyde n'est observé dans le cas de l'eau ultrapure (cf. figure 4-8). Les concentrations de ces composés restent inférieures à la LQ de la méthode après 10 jours pour toutes les températures d'exposition. Les teneurs dans l'eau gazeuse bien que très variables restent quasiment constantes quelque soit la température d'exposition. Ces observations suggèrent que le formaldéhyde migrerait plus facilement dans l'eau carbonatée et que le formaldéhyde disponible pour la migration est très rapidement extrait du matériau.

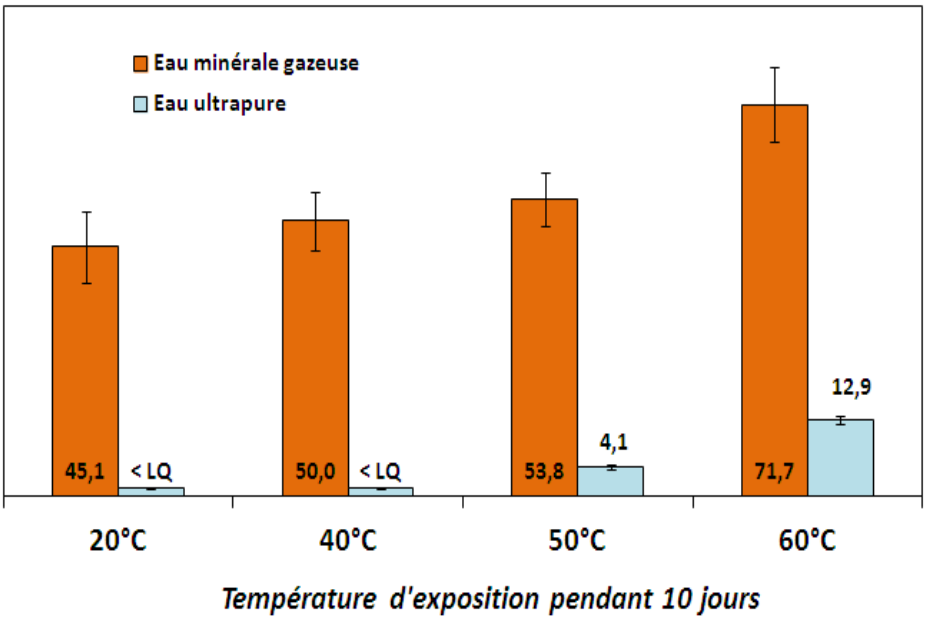


Figure 4-9: Concentrations d'acétaldéhyde (µg/L) dans l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure conditionnée dans des bouteilles en PET de la marque B après 10 jours d'exposition à différentes températures.

La même tendance est observée sur la migration de l'acétaldéhyde (cf. figure 4-9) dans l'eau gazeuse après 10 jours d'exposition à 40°C et 50°C. Dans ces conditions, la concentration d'acétaldéhyde reste invariable aux alentours de 50 µg/L dans l'eau gazeuse. Les concentrations en acétaldéhyde sont plus stables que les teneurs relevées en formaldéhyde. On observe un léger impact de la température favorisant la migration de l'acétaldéhyde à partir de 60°C. A la différence encore du formaldéhyde, il semble donc que l'ensemble de l'acétaldéhyde pouvant migrer n'est pas totalement extrait dans les premiers jours de contact. Avec de l'eau ultrapure et/ou en augmentant la température, il est possible d'obtenir des quantités d'acétaldéhyde en augmentation par rapport aux conditions initiales.

En contradiction avec cette étude, Ceretti *et al.* (2010) ont montré des concentrations d'acétaldéhyde dans l'eau gazeuse inférieur à la LQ (< 2 µg/L) avec les mêmes conditions d'exposition (10 jours à 40°C).

Comme rapporté par Nijssen *et al.* (1996), cet effet de la carbonatation de l'eau observée sur la migration du formaldéhyde et l'acétaldéhyde pourrait être aussi combiné au pH relativement acide de l'eau gazeuse (pH = 5,3). Cependant dans la présente étude, la proximité entre le pH de l'eau gazeuse et celui de l'eau ultrapure (pH ≈ 6) fait penser que la migration serait plutôt liée à la présence de CO_2 dans l'eau.

En outre, Dabrowska *et al.* (2003) ont affirmé que la migration des aldéhydes dans l'eau gazeuse n'était pas directement liée à la carbonatation, mais que c'était la pression exercée sur les parois des bouteilles par le gaz comprimé qui favorisait le relargage de ces molécules. Contrairement, à ces derniers auteurs, Bach *et al.* 2010 ont observé que le degré de carbonatation, qui conditionne la pression plus ou moins forte exercée sur les parois des bouteilles, ne semble pas influencer le niveau de migration. En effet, pour un même type d'eau (légèrement gazéifiée ou fortement gazéifiées) on obtenait la même concentration d'acétaldéhyde au bout de 45 jours à température ordinaire (environ 35 µg/L) et à 40°C (environ 65 µg/L) (cf. figure 4-10).

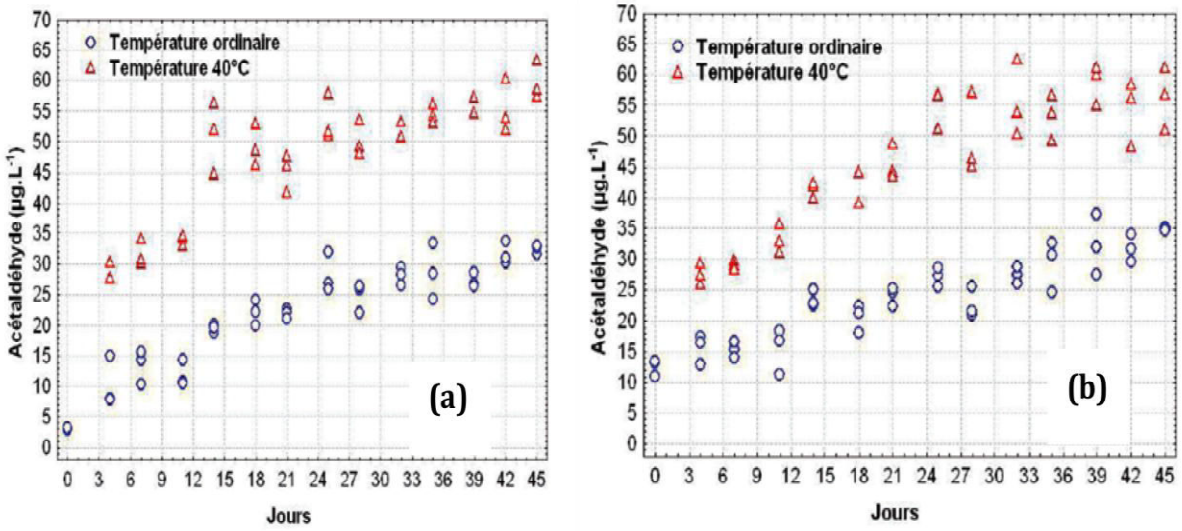


Figure 4-10: Cinétique de migration de l'acétaldéhyde dans une eau de source légèrement gazeuse (a) et le même type d'eau fortement gazeuse (b) à température ordinaire et à 40°C pendant 45 jours (Bach *et al.* 2010)

Bien que pour toutes les températures d'essai, les teneurs dans l'eau ultrapure du formaldéhyde et de l'acétaldéhyde ne dépassent pas les LMS établies par la toute récente réglementation européenne (EU, 2011), l'utilisation de l'EUP comme simulant alimentaire sous-estime la migration du formaldéhyde et l'acétaldéhyde du PET vers l'eau gazeuse. L'eau EUP n'est pas adéquate pour reproduire la migration de ces deux composés dans l'eau gazeuse.

4.5.2 Impact de l'exposition solaire

- **Eau minérale plate**

Les concentrations de formaldéhyde et d'acétaldéhyde retrouvées dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure dans les bouteilles de la marque A au cours d'exposition à la lumière solaire sont représentées dans les figures 4-11 et 4-12. La moyenne des concentrations pour l'eau minérale plate et l'eau ultrapure a été calculée à partir de 5 réplicats et 4 réplicats, respectivement. Au temps «*t = 0 jour*» sont reportées les concentrations correspondant au temps de stockage des bouteilles entre leur conditionnement et l'ouverture pour analyse avant exposition dans des conditions contrôlées (temps de contact de 4 mois). Dans le cas de l'eau ultrapure (EUP), *t = 0 jour* correspond à la composition de l'eau avant remplissage de bouteilles pour l'exposition à la lumière solaire.

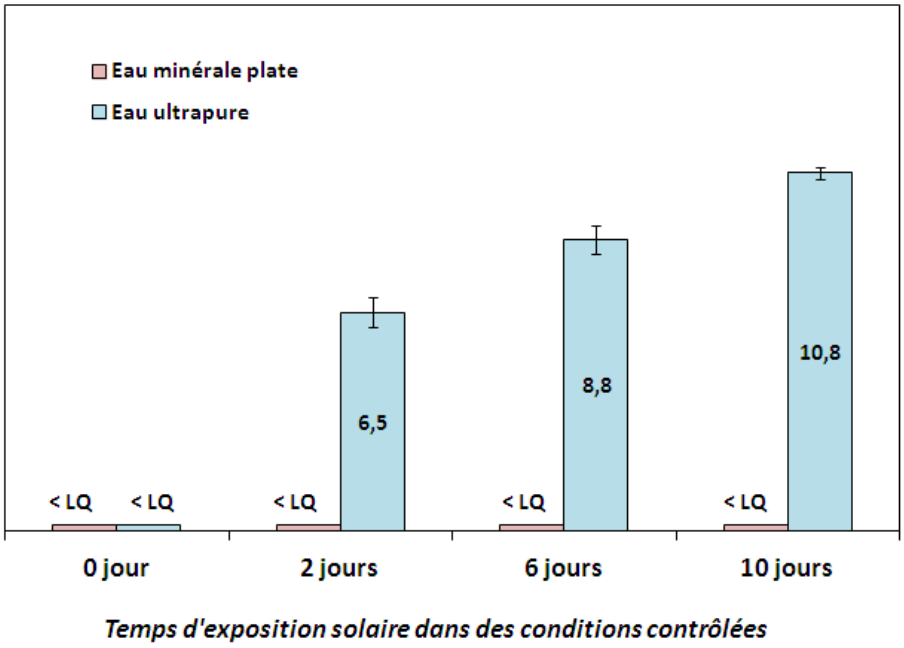


Figure 4-11: Concentrations du formaldéhyde dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure conditionnée dans des bouteilles en PET de la marque A exposées pendant 2, 6 et 10 jours à la lumière solaire. La limité de quantification(LQ) de la méthode d'analyse est 3,5 µg/L

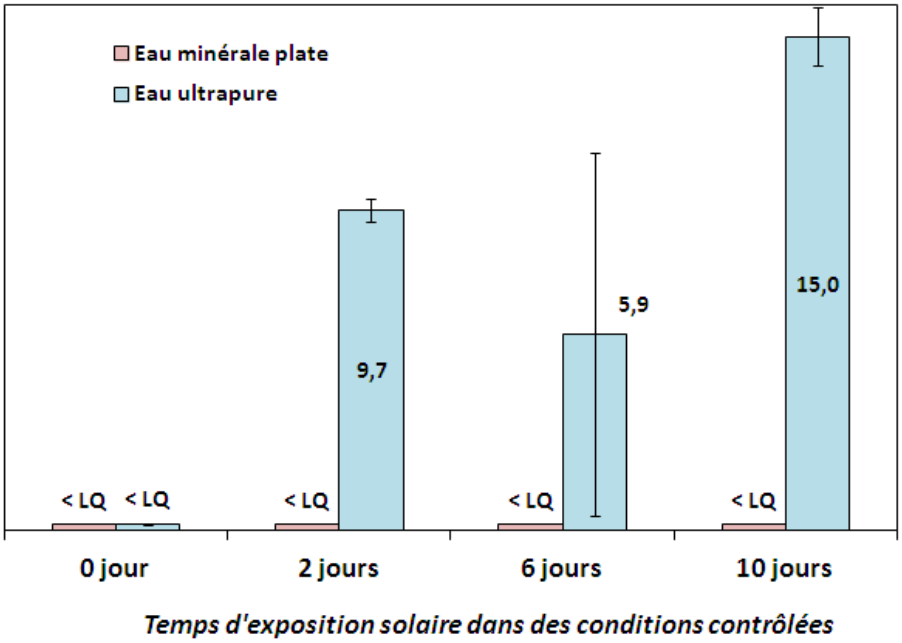


Figure 4-12: Concentrations d'acétaldéhyde dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure conditionnée dans des bouteilles en PET de la marque A exposées la lumière solaire au cours du temps. La limite de quantification (LQ) de la méthode d'analyse est 2 µg/L

Les deux types d'eau (minérale plate et EUP) conditionnées dans le même matériau PET montrent un comportement totalement différent vis-à-vis du formaldéhyde et l'acétaldéhyde.

Sur la figure 4-11, une augmentation de la teneur du formaldéhyde dans l'eau ultrapure est observée au cours de l'exposition solaire. Par contre dans l'eau minérale plate, la concentration du formaldéhyde reste inférieure à la LQ au cours du temps. Ce même phénomène est également observé pour l'acétaldéhyde (cf. figure 4-12).

Par rapport à la littérature, les résultats obtenus sur la migration de l'acétaldéhyde lors de cette étude ne concordent pas avec ceux présentés par Wegelin *et al.* (2001). Ces auteurs avec des conditions similaires d'exposition au présent travail (286,56 MJ/m^2 d'irradiation) ont montré une concentration d'acétaldéhyde de 6 µg/L dans une eau minérale plate embouteillée en PET.

Sur la présente étude, l'effet de la typologie de l'eau sur la migration de ces deux molécules par l'action de la lumière solaire peut expliquer l'absence de formaldéhyde et acétaldéhyde. Certaines eaux minérales pourraient avoir la capacité d'empêcher la migration ou favoriser la dégradation ces composés carbonylés. D'une part, Mutsuga *et al.* (2006) ont rapporté que certaines eaux minérales contiennent des bactéries hétérotrophes, qui utilisent le formaldéhyde et l'acétaldéhyde en tant que source carbone. D'autre part, Nijssen *et al.* (1996) ont suggéré qu'une augmentation progressive d'oxygène dans la bouteille pendant son stockage peut favoriser l'oxydation et/ou la réduction de l'acétaldéhyde. Ces réactions de dégradation sont catalysées par le pH acide de l'eau.

Dans ce travail, le contenu en bactéries dans les eaux testées n'a pas été déterminé. Cependant, la possibilité d'une décomposition biologique a été écartée en raison du fait que l'exposition solaire détruit les micro-organismes présents dans l'eau. En effet, la méthode SODIS (*Solar Water Desinfection*) est un procédé basé sur la désinfection de l'eau par irradiation solaire pour obtenir de l'eau potable sans germes infectieux (http://www.sodis.ch/index_FR). Par rapport au pH, l'eau ultrapure est légèrement plus acide (pH ≈ 5-6) que l'eau minérale plate de la marque A (pH = 7,2). Cependant, cette différence de pH n'est pas assez significative pour expliquer la présence d'acétaldéhyde dans l'eau ultrapure et son absence dans l'eau minérale plate. L'influence du pH sur la migration des aldéhydes du matériau PET au contact de l'eau déminéralisé été étudiée par Dabrowska *et al.* (2003). Aucune différence sur la migration de l'acétaldéhyde n'a été observée entre l'eau à pH 4,5 et à 6,5.

Cette différence de comportement entre l'eau ultrapure et l'eau minérale plate trouve peut-être une explication dans l'écart de minéralisation entre ces deux eaux. L'absence d'ions dans l'eau ultrapure et son caractère relativement agressif pourraient expliquer l'apparition d'aldéhydes après exposition solaire.

- **L'eau minérale gazeuse**

Les concentrations de formaldéhyde et acétaldéhyde détectées pour l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure dans les bouteilles de la marque B au cours du temps sont représentées dans les figures 4-13 et 4-14. La moyenne des concentrations pour l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure a été calculée à partir de 5 réplicats et 4 réplicats, respectivement. Le temps de contact moyen entre l'embouteillage et l'analyse initiale est dans le cas présent de 6 mois.

La figure 4-13 et la 4-14 montrent que le formaldéhyde et l'acétaldéhyde étaient présents dans l'eau minérale gazeuse avant exposition des bouteilles (*t = 0 jour*). Cela suggère que la migration de ces deux composés a débuté pendant le transport et le stockage des bouteilles dans les magasins.

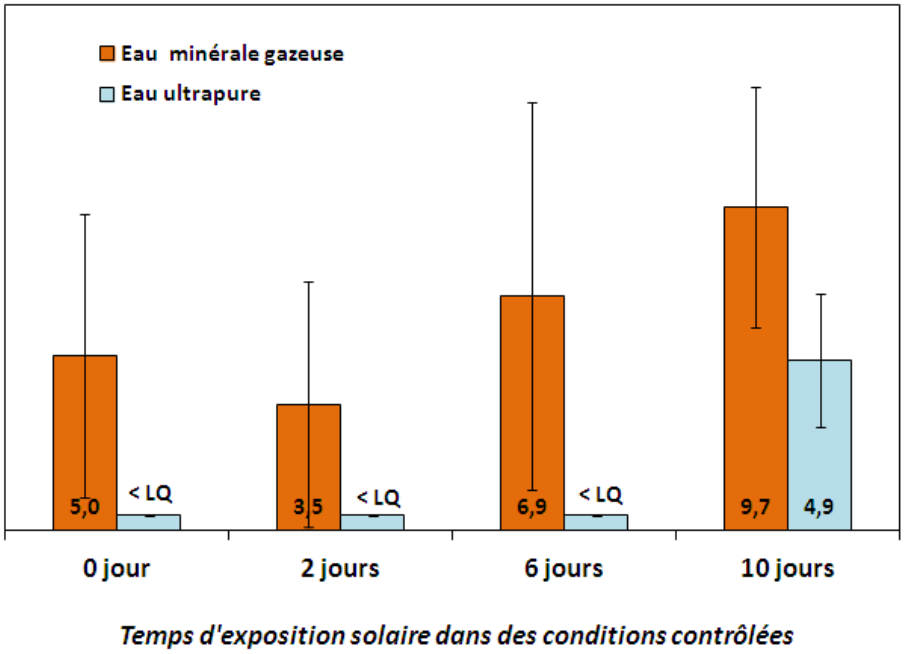


Figure 4-13: Concentrations de formaldéhyde (µg/L) dans l'eau gazeuse et l'eau ultrapure conditionnées dans des bouteilles en PET de la marque B au cours du temps à la lumière solaire. La limite de quantification (LQ) de la méthode d'analyse est 3,5 µg/L

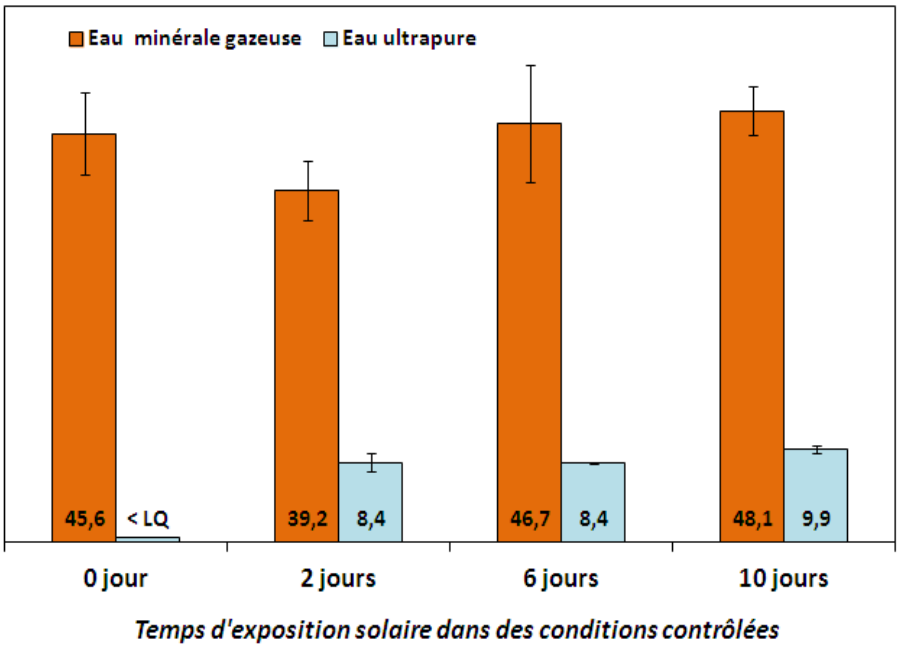


Figure 4-14: Concentrations d'acétaldéhyde (µg/L) dans l'eau gazeuse et l'eau ultrapure conditionnées dans des bouteilles en PET de la marque B au cours du temps par action de la lumière solaire. La limite de quantification (LQ) de la méthode est 2 µg/L

L'effet de l'exposition solaire sur la migration du formaldéhyde n'est observé de façon significative qu'au bout de 10 jours. En effet, il y a une apparition de ce composé dans l'eau ultrapure et sa teneur moyenne double par rapport à la valeur initiale (*t = 0 jour*).

Par contre, la concentration d'acétaldéhyde à *t = 0 jour* (45,6 µg/L) reste pratiquement invariable au bout de 10 jours d'exposition solaire. On remarque le même phénomène dans l'eau ultrapure, où la migration cette molécule est observée au bout de 2 jours d'exposition avec une concentration à 8,4 µg/L qui reste pratiquement stable pour les autres périodes de temps.

Les résultats obtenus pour l'acétaldéhyde suggèrent qu'à *t = 0 jour* la migration de se composés était déjà stabilisée. La figure 4-17 montre la cinétique de migration de l'acétaldéhyde depuis le PET vers cette même au gazeuse. Il a été mis en évidence que l'acétaldéhyde migre rapidement pendant les premiers jours de stockage de la bouteille et que la migration se stabilise au bout d'environ 40 jours (Bach *et al.*, 2011).

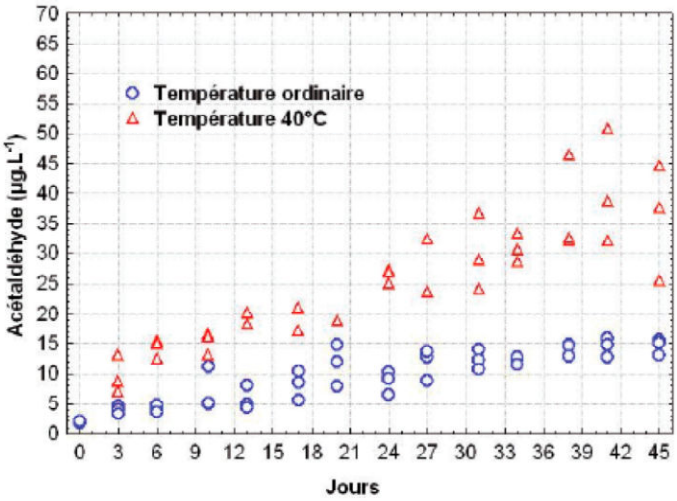


Figure 4-15: Cinétique de migration de l'acétaldéhyde à température ordinaire et à 40°C durant 45 jours dans l'eau minérale plate gazeuse conditionnée dans une bouteille tricouche (PET-PA-PET) (Bach, C. *et al*. 2010)

Les résultats de cette étude montrent que l'utilisation de l'eau ultrapure, comme simulant, n'est pas adaptée pour reproduire la migration du formaldéhyde et de l'acétaldéhyde dans l'eau gazeuse. La carbonatation de l'eau entraîne le relargage de teneurs en formaldéhyde et en acétaldéhyde supérieures à celles observées pour l'eau ultrapure. Cependant, les concentrations de formaldéhyde et d'acétaldéhyde dans l'eau gazeuse restent inférieures aux seuils réglementaires de 15 mg/kg et 6 mg/kg, respectivement (EU, 2011).

Par rapport à la littérature, aucune étude sur la migration de formaldéhyde et l'acétaldéhyde du PET vers l'eau gazeuse par exposition solaire n'a été publiée.

4.5.3 Comparaison de l'effet température et l'effet exposition solaire sur la migration du formaldéhyde et acétaldéhyde.

Dans le tableau 4-3 ont été présentées les températures moyennes et maximales atteintes pour l'eau ultrapure dans les bouteilles A et B exposées à la lumière directe. Ces valeurs sont pour les deux types de bouteilles après 10 jours d'exposition solaire : 27,6°C de moyenne (sur 24 h).

La comparaison des concentrations de formaldéhyde et acétaldéhyde retrouvées pour l'exposition solaire et l'exposition des bouteilles après 10 jours à température ordinaire (fixée à 20°C dans cette étude) et 40°C pour l'eau des bouteilles A et B sont exposées dans le tableau 4-4.

Tableau 4-4: Concentrations de formaldéhyde et acétaldéhyde dans l'eau ultrapure (EUP) après 10 jours d'exposition solaire et après 10 jours à température ordinaire, à 40°C et à 60°C à l'abri de la lumière solaire

	Effet de l'exposition solaire après 10 jours		**Effet température après 10 jours**					
	Température moyenne 27,6 °C		**Température « 20°C »**		**Température 40°C**		**Température 60°C**	
	Bouteille A (µg/L)	*Bouteille B* (µg/L)	*Bouteille A* (µg/L)	*Bouteille B* (µg/L)	*Bouteille A* (µg/L)	*Bouteille B* (µg/L)	*Bouteille A* (µg/L)	*Bouteille B* (µg/L)
Formaldéhyde dans l'eau EUP	10,8	4,9	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	5,1	< LQ
Acétaldéhyde dans l'eau EUP	15,0	9,9	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	20,0	12,9

Après 10 jours à 20°C ou 40°C, les concentrations en acétaldéhyde et formaldéhyde sont inférieures à la LQ. A 60°C, on observe l'apparition d'acétaldéhyde et du formaldéhyde pour la marque A et uniquement d'acétaldéhyde pour la marque B.

Si on compare ces concentrations à celles obtenues après une exposition solaire de 10 jours, on constate que les niveaux de concentration en formaldéhyde sont plus élevés que ceux obtenus à 60°C. Ceci tendrait à montrer que le relargage ou la formation de cet aldéhyde est surtout influencé par l'exposition solaire.

Pour l'acétaldéhyde, les niveaux de concentration sont similaires dans les deux types d'exposition. Ceci tendrait à montrer que la migration ou la formation de cet aldéhyde est influencé soit par la température soit par l'exposition à la lumière.

4.6 RESULTATS EXPERIMENTAUX SUR LA MIGRATION DES ELEMENTS INORGANIQUES DANS L'EAU EMBOUTEILLEE

Comme décrit dans la section 3.9, la quantification des éléments inorganiques a été réalisée par ICP-MS. Les résultats expérimentaux sont exposés dans les sections suivantes.

4.6.1 Impact de la température

Dans les tableaux 4.5 et 4.6 sont présentées les concentrations des éléments inorganiques retrouvés dans l'eau minérale plate (marque A) et dans l'eau minérale gazeuse (marque B), conditionnées chacune en verre et en PET.

Tableau 4-5: Concentrations des éléments inorganiques dans l'eau plate embouteillée en PET et verre à t = 0 *jour* et après 10 jours d'expositions à 60°C dans des conditions contrôlées (*t = 10 jours*). Les concentrations ont été obtenues en calculant la moyenne de 5 réplicats

	Eau minérale plate embouteillée de la marque A				
Eléments	**Résultats enquête national 2006 (µg/L)**	**Eau en bouteille PET**		**Eau en bouteille verre**	
		t_{0jour} (µg/L)	**$t_{10jours}$ à 60°C (µg/L)**	**t_{0jour} (µg/L)**	**$t_{10jours}$ à 60°C (µg/L)**
Li^+	***6***	*6,2*	*6,3*	*6,3*	*6,6*
Sr^{++}	***370***	*371*	*368*	*370*	*376*
Sb	***< 1***	***0,9***	***4,3***	***< 0,2***	***< 0,2***
Ba	***110***	*124*	*121*	*125*	*124*
B	***< 50***	*9,9*	*10,1*	*9,9*	*10,4*
U	***2***	*2,4*	*2,1*	*2,4*	*2,2*
Rb	***< 1***	*1,0*	*1,1*	*1,0*	*1,1*
Sc	***2***	*1,6*	*1,8*	*1,8*	*2,4*

Tableau 4-6: Concentrations des éléments inorganiques dans l'eau gazeuse embouteillée en PET et verre à t = 0 *jour* et après 10 jours d'expositions à 60°C dans des conditions contrôlées (*t = 10 jours*). Les concentrations ont été obtenues en calculant la moyenne de 5 réplicats

	Eau minérale gazeuse embouteillée de la marque B				
Eléments	**Résultats enquête national 2006 (µg/L)**	**Eau en bouteille PET**		**Eau en bouteille verre**	
		t_{0jour} (µg/L)	**$t_{10jours}$ à 60°C (µg/L)**	**t_{0jour} (µg/L)**	**$t_{10jours}$ à 60°C (µg/L)**
Li^+	***4***	*4,7*	*5,2*	*4,3*	*4,4*
Sr^{++}	***700***	*717*	*770*	*681*	*690*
Sb	***< 1***	***1,1***	***8,0***	***< 0,2***	***< 0,2***
Ba	***31***	*39*	*38*	*36*	*37*
B	***< 50***	*31*	*33*	*29*	*28*
Pb	***<1***	***<0,1***	***<0,1***	***0,3***	***0,4***
Se	***2***	*1,8*	*< 1*	*1,3*	*1,3*
U	***5***	*5,3*	*4,1*	*5,1*	*5,1*
Rb	***< 1***	*1,0*	*1,1*	*1,0*	*1,0*
Sc	***3***	*2,9*	*2,1*	*2,9*	*3,1*

Les bouteilles ont été exposées à 40°C, 50°C et 60°C pendant 10 jours. Cependant, aucun impact de la température sur la teneur de la plupart des éléments présents dans l'eau plate et l'eau gazeuse n'a été observé entre *t = 0 jour* et *t = 10 jours* à 60°C. La plupart des éléments quantifiés font partie de la composition naturelle de l'eau. Pour les différentes températures, leurs concentrations restent stables aussi bien pour le conditionnement en PET et que celui en verre. Seuls deux éléments trouvés dans les eaux embouteillées en PET et en verre ont été identifiés comme exogènes : le plomb (Pb) et l'antimoine (Sb).

Le plomb est un métal qui est absent dans l'ensemble des eaux embouteillées en PET. Cependant, l'eau conditionnée en bouteille verre (marque B) est remarquable, car elle contient du plomb, à des teneurs variant entre 0,3 et 0,4 µg/L (cf. tableau 4-6). Ce métal est donc issu du conditionnement verre, sans toutefois augmenter après 10 jours à différentes températures d'exposition (40°C, 50°C et 60°C).

Reimann *et al.* (2010) ont aussi observé la présence de cet élément dans l'eau embouteillée en verre. Ces auteurs ont trouvé une concentration maximale de Pb de 0,1 µg/L dans l'eau déminéralisée ajustée à pH = 6, conditionnée en verre, après 150 jours de stockage à température ordinaire.

Comme attendu, l'antimoine est caractéristique des eaux embouteillées en PET et sa teneur évolue avec les différentes températures d'exposition. L'impact de la température sur la migration de Sb en fonction de la typologie de l'eau et la surface de contact est discuté ci-dessous.

- **Typologie de l'eau**

L'évolution de la concentration d'antimoine en fonction de différentes températures et l'impact de la typologie de l'eau (plate/gazeuse) par comparaison avec l'eau ultrapure sont présentés sur les figures 4.16 et 4.17. Dans le cas présent le temps moyen de contact entre l'embouteillage et les analyses initiales est de 12 mois de temps de contact moyen pour la marque A contre 11 pour la marque B.

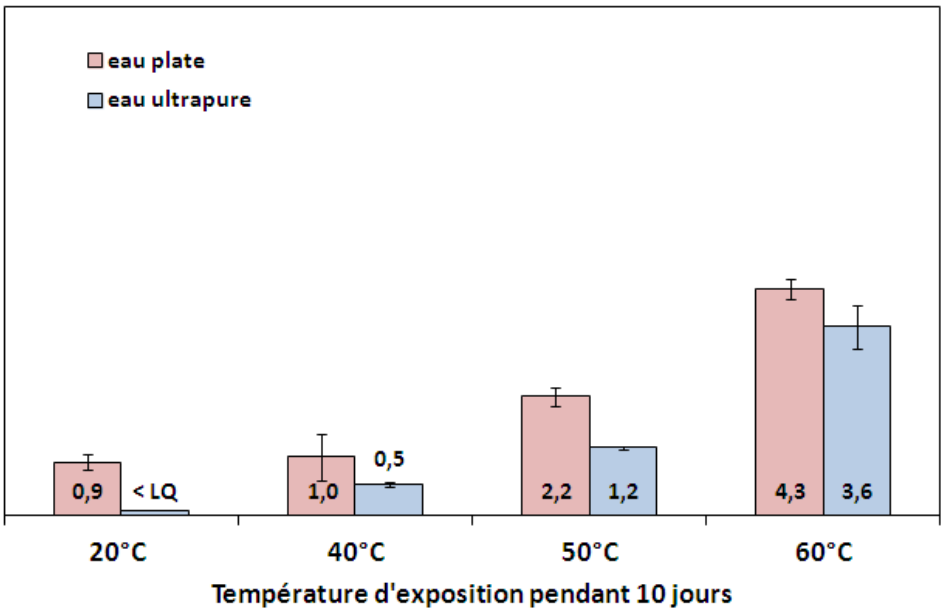


Figure 4-16: Concentrations d'antimoine (µg/L) dans l'eau minérale plate et l'eau ultrapure conditionnées dans les bouteilles en PET de la marque A après 10 jours d'exposition dans de conditions contrôlées à différentes températures. L'exposition à température ordinaire a été fixée arbitrairement à 20°C. La LQ de l'antimoine est 0,2 µg/L

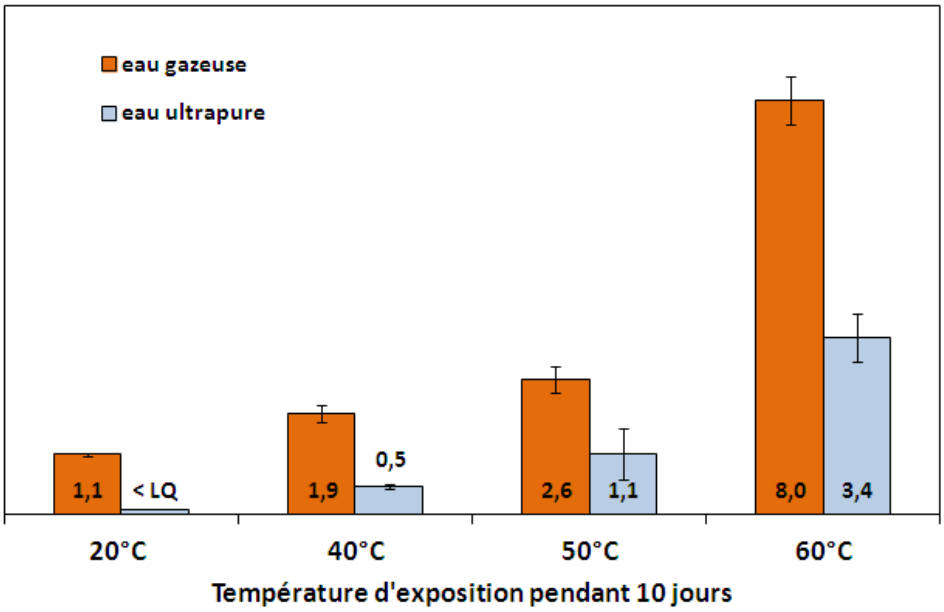


Figure 4-17: Concentrations d'antimoine (µg/L) dans l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure conditionnées dans les bouteilles en PET de la marque B après 10 jours d'exposition dans de conditions contrôlées à différentes températures. L'exposition à température ordinaire a été fixée arbitrairement à 20°C. La LQ de l'antimoine est 0,2 µg/L

Sur la figure 4-16, un effet de la température est observé sur la migration de l'antimoine. La teneur en antimoine augmente dans l'eau plate et l'eau ultrapure en fonction de la température d'exposition des bouteilles. Westerhoff *et al.* (2008), Keresztes *et al.* (2009) et Cheng *et al.* (2010) avait déjà établi, que les températures élevées augmentaient significativement la migration de l'antimoine depuis le PET vers l'eau.

La figure 4-16 montre que, bien qu'ayant remplacé l'eau minérale plate par de l'eau ultrapure, on atteint pratiquement les mêmes niveaux de concentration en antimoine au bout de 10 jours à 60°C. Avec l'eau ultrapure, on commence les expositions avec des niveaux en antimoine inférieurs à la LQ, contre un niveau initial dans l'eau minérale plate de 0,9 µg/L. Ce décalage reste constant après 10 jours, mais on voit clairement que face à l'eau ultrapure ce PET continue de laisser migrer de l'antimoine. Dans ce cas de figure, c'est le facteur température qui semble prépondérant.

Par contre, la figure 4-17 montre que la migration de Sb dans l'eau gazeuse (marque B) est accélérée par la présence de CO_2. Au bout de 10 jours d'exposition à 60°C, la concentration d'antimoine dans l'eau gazeuse (8 µg/L) est largement supérieure à celle observée dans l'eau ultrapure (3,4 µg/L). Par conséquent, on peut suspecter que la migration de l'antimoine dans les eaux gazeuses est influencée par la présence CO_2 combinée à la température.

Keresztes *et al.* (2009) ont aussi rapporté que la diffusion de l'antimoine sous l'effet de la température était plus importante dans l'eau gazeuse. Cependant, ces auteurs attribuent cet effet au pH acide de l'eau gazeuse situé entre 4,27 et 5,27 pour l'eau embouteillée utilisée pour ces essais. En opposition, Shotyk *et al.* (2006) et Shotyk et Krachler (2007) ont rapporté que le pH de l'eau entre 6 et 8 n'a pas d'impact sur la migration de l'antimoine. Dans notre étude, la différence de pH entre l'eau gazeuse (pH = 5,5) et l'eau ultrapure (pH ≈ 5,5-6) n'est pas significative pour avoir un impact sur la migration de l'antimoine. C'est donc le CO_2 qui accélère la diffusion de l'antimoine, dans notre cas figure.

- **Surface de contact**

De manière à évaluer l'influence de la surface de contact sur la migration de l'antimoine, les teneurs trouvées dans l'eau ultrapure conditionnée dans les bouteilles PET de la marque A et B en fonction des différentes températures d'exposition ont été représentées sur la figure 4-18.

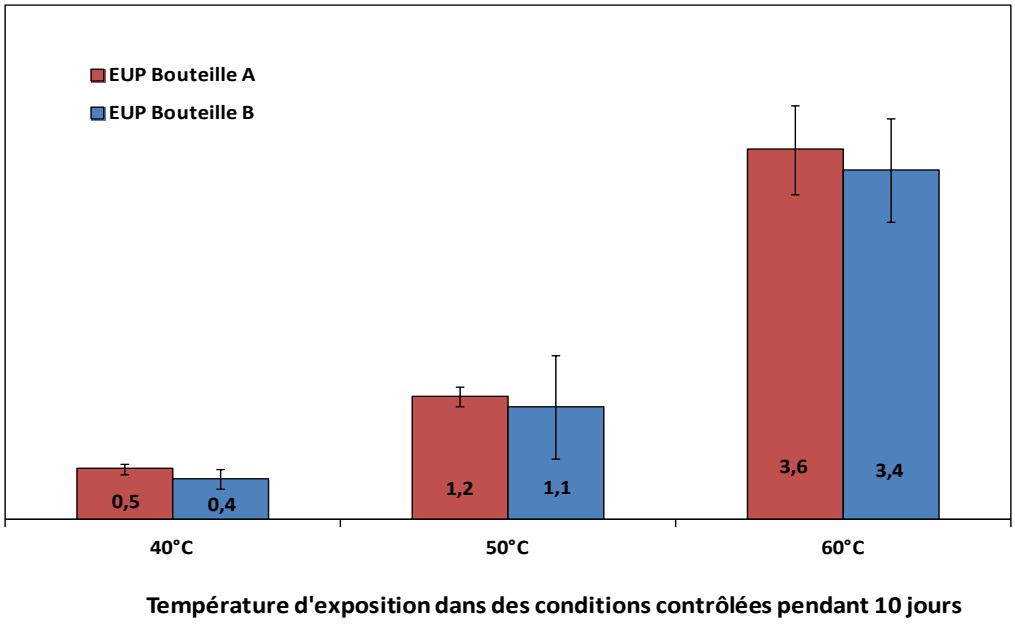


Figure 4-18: Comparaison des teneurs d'antimoine dans l'eau ultrapure (EUP) conditionnée dans les bouteilles des marques A et B après 10 jours d'exposition à différentes températures. Les mesures sont les résultats de 5 réplicats pour chaque température

Les concentrations en antimoine du matériau ont été déterminées suivant un protocole fourni en annexe. Les teneurs trouvées sont respectivement de 302 mg/kg de PET et 254 mg/kg de PET pour les marques A et B.

Les ratios surface/volume de ces deux marques ont également été estimés et sont respectivement de 517 cm^2/L et 593 cm^2/L. Cette estimation faite sur la base de surface lisse est certainement sous-évaluée pour la bouteille A dont la surface est très en relief. En première approximation, on peut penser que ces ratios sont finalement très proches pour les deux marques.

L'examen de la figure 4-18 montre que pour les deux marques, les teneurs finales en antimoine sont similaires en fonction de la température d'exposition. Les deux marques sont finalement assez identiques sur le plan de la diffusion de l'antimoine. La concentration résiduelle du PET plus élevée de la marque A (302 mg/kg) est « compensée » par un ratio surface volume moins favorable à cette diffusion (517 cm^2/L). Keresztes *et al.* (2009) ont rapporté que les eaux embouteillées dans des volumes plus petits présentent des concentrations de Sb plus élevées.

4.6.2 Impact de l'exposition solaire

Les concentrations des éléments inorganiques détectées dans l'eau embouteillée avant et après exposition solaire pendant 10 jours sont exposées dans les tableaux 4-7 et 4-8. Comme pour l'exposition à la température, seules les teneurs à *t = 0 jour* et *t = 10 jours* sont présentées. Les éléments n'appartenant pas à la composition naturelle de chaque type d'eau minérale (soulignés en rouge) sont l'antimoine et le plomb.

Tableau 4-7: Concentrations des éléments inorganiques dans l'eau plate embouteillée en PET et verre à t = 0 *jour* et après 10 jours d'expositions solaire dans des conditions contrôlées (*t = 10 jours*). Les concentrations ont été obtenues en calculant la moyenne de 5 réplicats

	Eau minérale plate embouteillée de la marque A				
Eléments	**Résultats enquête national 2006**	**Eau en bouteille PET**		**Eau en bouteille verre**	
		t_{0jour} (µg/L)	**$t_{10jours}$ (µg/L)**	**t_{0jour} (µg/L)**	**$t_{10jours}$ (µg/L)**
Li^+	***6***	*6,6*	*6,4*	*7,3*	*7,3*
Sr^{++}	***370***	*419*	*419*	*411*	*416*
Sb	***< 1***	***0,7***	***1,0***	***< 0,2***	***< 0,2***
Ba	***110***	*122*	*124*	*121*	*122*
B	***< 50***	*10,1*	*9,4*	*12,5*	*12,3*
Pb	***< 1***	***< 0,1***	***<0,1***	***<0,1***	***<0,1***
U	***2***	*2,0*	*2,0*	*2 ,1*	*2,1*
Rb	***< 1***	*1,0*	*1,1*	*1,0*	*1,1*
Sc	***2***	*3,3*	*3,1*	*3,1*	*3,2*

Tableau 4-8: Concentrations des éléments inorganiques dans l'eau gazeuse embouteillée en PET et verre à t = 0 *jour* et après 10 jours d'expositions solaire dans des conditions contrôlées (*t = 10 jours*). Les concentrations ont été obtenues en calculant la moyenne de 5 réplicats

	Eau minérale gazeuse embouteillée de la marque B				
Eléments	**Résultats enquête national 2006**	**Eau en bouteille PET**		**Eau en bouteille verre**	
		t_{0jour} (µg/L)	**$t_{10jours}$ (µg/L)**	**t_{0jour} (µg/L)**	**$t_{10jours}$ (µg/L)**
Li^+	***4***	*5,0*	*5,6*	*4,4*	*5,2*
Sr^{++}	***700***	*716*	*793*	*684*	*751*
Sb	***< 1***	***1,1***	***2,0***	***< 0,2***	***< 0,2***
Ba	***31***	*38*	*38*	*37*	*35*
B	***< 50***	*31*	*37*	*29*	*34*
Pb	***< 1***	***<0,1***	***< 0,1***	***0,4***	***0,3***
Se	***2***	*1,9*	*1 ,3*	*1,3*	*1,1*
U	***5***	*5,1*	*4,1*	*5,1*	*4,0*
Rb	***< 1***	*1,1*	*1,2*	*1,1*	*1,1*
Sc	***2***	*3,9*	*3,2*	*3,9*	*3,1*

En ce qui concerne le plomb, comme sur l'exposition à la température des bouteilles, les mêmes concentrations constantes entre 0,4 et 0,3 µg/L au cours du temps (0, 2, 6, 10 jours) ont été trouvées dans l'eau gazeuse conditionnée en verre de la marque B (cf. tableau 4-8).

Par rapport à l'antimoine, l'évolution de sa teneur dans l'eau embouteillée au cours de l'exposition solaire est discutée par la suite en fonction du type d'eau et de la surface de contact PET/ eau.

- **Typologie de l'eau**

Sur les figures 4-19 et 4-20 sont représentées les cinétiques de migration de l'antimoine au cours de l'exposition solaire pour les deux types d'eaux embouteillées (plate/gazeuse) et l'EUP, conditionnées dans les bouteilles des marques A et B. Comme indiqué, le *t = 0 jour* correspond à la concentration initiale résultant de la migration entre le conditionnement de l'eau dans la bouteille et le début de l'exposition solaire. Dans le cas de l'EUP, le *t = 0 jour* correspond à la concentration d'antimoine avant le remplissage des bouteilles pour la réalisation des essais.

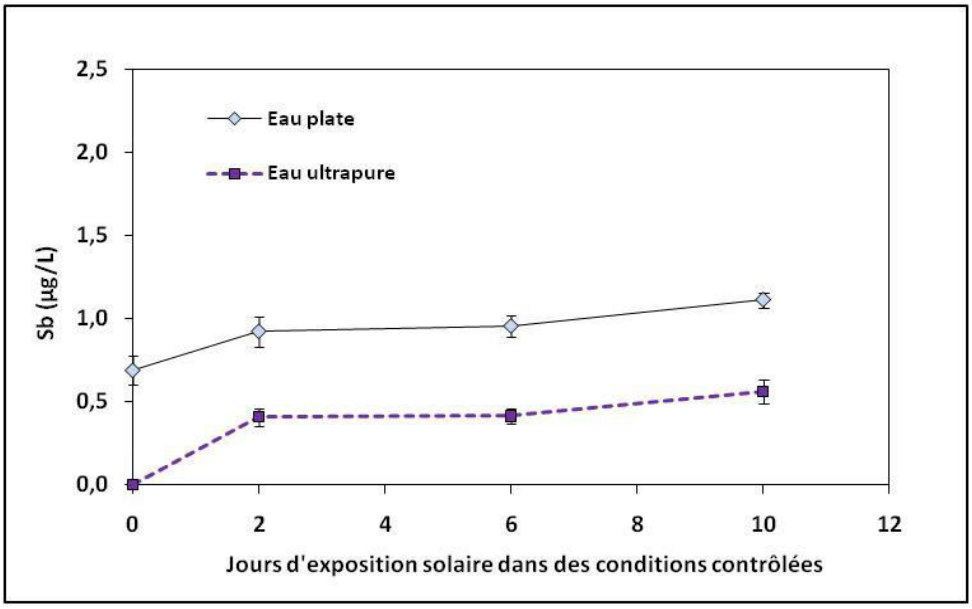


Figure 4-19: Evolution de la concentration d'antimoine pour l'eau minérale plate et l'eau ultrapure dans les bouteilles de la marque A en fonction du temps d'exposition solaire. La moyenne de concentration a été calculée à partir de 5 réplicats pour chaque temps d'exposition

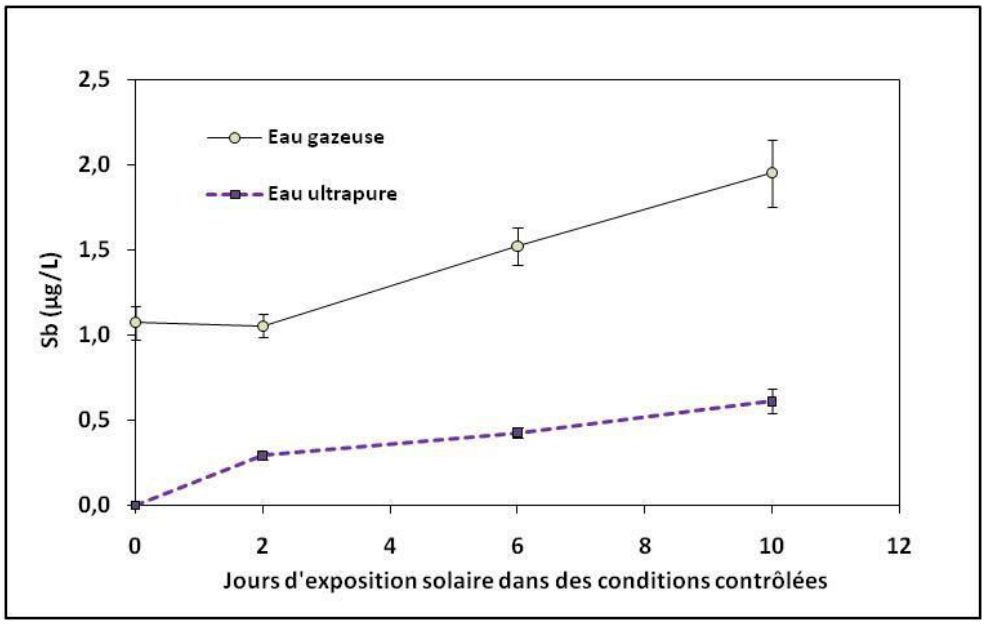


Figure 4-20: Evolution de la concentration d'antimoine pour l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure dans les bouteilles de la marque B en fonction du temps d'exposition solaire. La moyenne de concentration a été calculée à partir de 5 réplicats pour chaque temps d'exposition

A partir de la figure 4-19, on constate que la diffusion de cet élément est très légèrement accélérée par l'exposition solaire avec un profil cinétique identique pour l'eau plate et l'eau ultrapure. Il subsiste tout au long de l'essai un décalage de concentration entre les deux courbes, équivalent à la teneur initiale dans l'eau minérale (0,7 µg/L). Le décalage restant constant, la composition physico-chimique de l'eau au contact du PET ne semble pas avoir d'influence sur la migration de l'antimoine.

L'évolution des concentrations d'antimoine entre l'eau minérale gazeuse et l'eau ultrapure (cf. figure 4-20) dans les bouteilles de la marque B montre une influence de la typologie de l'eau. Même si comme dans le cas précédent, la migration de Sb à *t = 0 jour* démarre à 1,1 µg/L, le dioxyde de carbone associé à l'exposition solaire accélère considérablement la diffusion de Sb. Dans l'eau ultrapure, la cinétique de migration de cet élément dans les bouteilles de la marque B suit un profil identique à celui montré pour l'EUP de la marque A (cf. figure 4-19). La migration de l'antimoine du PET vers l'EUP pour les marques A et B aboutit à la même concentration au bout de 10 jours d'exposition solaire (0,5 µg/L). Par conséquent, l'exposition solaire a une faible influence sur la diffusion de l'antimoine dans les eaux plates. En revanche, associée au CO_2, la lumière solaire semble accélérer cette diffusion.

Par rapport à la littérature, seuls Cheng *et al.* (2010) ont étudié l'impact de l'exposition solaire sur l'eau ultrapure embouteillée en PET. De façon surprenante, pour un temps maximal d'exposition solaire de 7 jours, les concentrations de Sb trouvées dans l'EUP sont supérieures à celles trouvées au cours de notre étude. La gamme de concentrations va de 0,8 à 4,6 µg/L pour 6 marques différentes d'eau embouteillée. Le processus de fabrication de la bouteille pourrait expliquer ces différentes teneurs. Contrairement à cette étude, ces auteurs n'ont pas déterminé la concentration en antimoine dans le PET des bouteilles. En absence de ces informations, la comparaison avec les résultats de la présente étude s'avère impossible.

- **Surface de contact**

Sur la figure 4-21, la comparaison entre les teneurs d'antimoine trouvées dans l'eau ultrapure (EUP) selon le matériau de conditionnement en PET (marque A et marque B) présentées en fonction des différents temps d'exposition solaire. Ici encore, le ratio surface/volume moins favorable de la marque A est compensée par une teneur résiduelle légèrement plus élevée. Au final, les teneurs en antimoine retrouvées dans l'EUP après exposition solaire sur différentes durées restent identiques entre les deux marques.

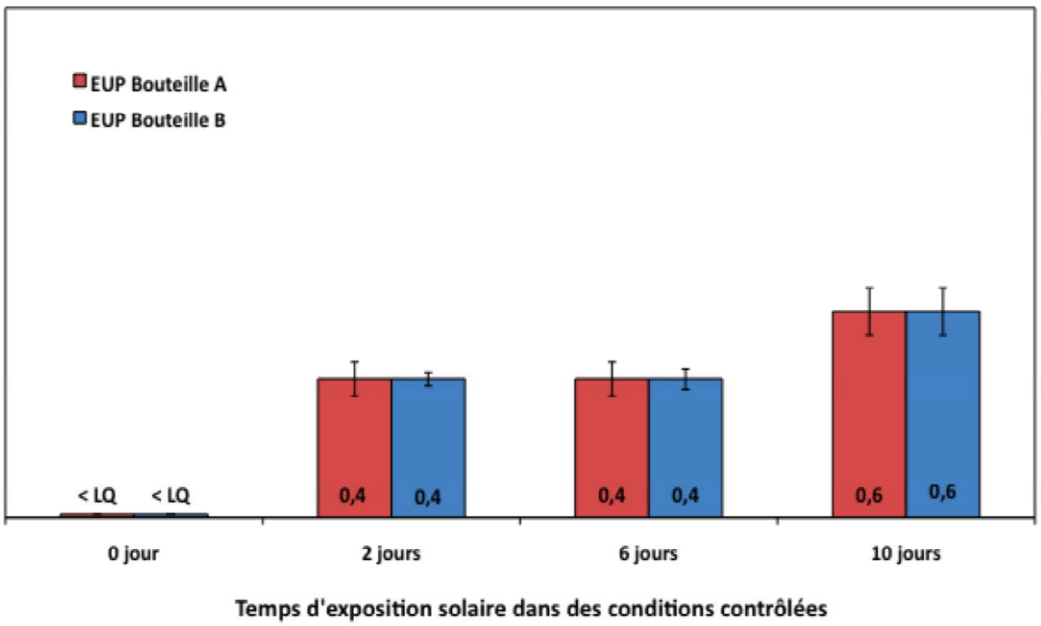


Figure 4-21: Comparaison des concentrations d'Sb dans l'eau ultrapure conditionnée dans les bouteilles de la marque A et B en fonction du temps d'exposition solaire. La LQ de la méthode d'analyse pour l'antimoine est 0,2 µg/L. La moyenne de concentration a été calculée à partir de 5 réplicats

4.6.3 Comparaison de l'effet température et l'effet exposition solaire sur la migration de l'antimoine

Sur le tableau 4-9, les concentrations en antimoine dans l'EUP conditionnée dans les bouteilles de la marque A et B après exposition à la lumière solaire et à la température sont présentées.

Tableau 4-9: Concentrations de Sb dans l'eau ultrapure (EUP) après 10 jours d'exposition solaire et après de 10 jours à température ordinaire (20°C), à 40°C et à 60°C à l'abri du soleil

Effet de l'exposition solaire après 10 jours		**Effet température après 10 jours**					
Température moyenne 27,6 °C		**Température « 20°C »**		**Température 40°C**		**Température 60°C**	
Bouteille A	*Bouteille B*	*Bouteille A*	*Bouteille B*	*Bouteille A*	*Bouteille B*	*Bouteille A*	*Bouteille B*
0,5 µg/L	0,5 µg/L	< LQ	< LQ	0,5µg/L	0,5µg/L	3,6 µg/L	3,4 µg/L

L'effet de la température est beaucoup plus remarquable que l'impact de l'exposition solaire. Les figures 4-19 et 4-20 montraient clairement que dans l'eau ultrapure, la lumière solaire avait peu d'influence sur la diffusion de l'antimoine. Dans le tableau 4-10, les concentrations finales obtenues après 10 jours à 40°C ou une exposition solaire de même durée, sont identiques (0,5 µg/L). Ce n'est qu'en exposant les bouteilles à des températures proches de *Tg* que l'on constate une diffusion significativement plus importante de l'antimoine (3,4 - 3,6 µg/L).

Finalement, toutes les teneurs de Sb détectées dans cette étude ne dépassent pas le seuil réglementaire fixé à 40 µg/kg pour le règlement 10/2011 (EU, 2011). Cependant, comme pour les aldéhydes, le simulant EUP sous-estime la migration de Sb dans les eaux gazeuses, et par conséquent, n'est pas un bon modèle pour estimer la migration dans les conditions réelles.

4.7 COMPOSITION DES EAUX EMBOUTEILLEES DE LA MARQUE A ET B EN PET ET VERRE EXPOSEES AUX CONDITIONS MAXIMALES DE TEMPERATURE ET DE LUMIERE SOLAIRE

Suite à ces différents essais, la composition finale des eaux embouteillées a pu être établie sur la base des outils analytiques utilisés. Ces informations pour les composés provenant du matériau sont indiquées dans les tableaux 4-10 et 4-11, avec les niveaux de concentrations pour chaque famille de substances. Seules les substances trouvées pour les conditions les plus sévères d'exposition solaire et de température sont présentées. Dans le prochain chapitre, le potentiel toxique de ces migrats, les plus concentrés, sera évalué.

Tableau 4-10 : Concentrations des molécules trouvées dans les eaux embouteillées en PET et verre de la marque A et B après 10 jours d'exposition à 60°C

	Eau minérale plate (A)		**Eau minérale gazeuse (B)**	
	PET	**Verre**	**PET**	**Verre**
2,4-di-*tert*-butylphénol	< 0,3 µg/L	1,6 µg/L	1,0 µg/L	0,4 µg/L
Formaldéhyde	5,1 µg/L	< 3,5 µg/L	8,4 µg/L	< 3,5 µg/L
Acétaldéhyde	17,2 µg/L	< 2 µg/L	71,7 µg/L	< 2 µg/L
Sb	4,3 µg/L	< 0,2 µg/L	8,0 µg/L	< 0,2 µg/L
Pb	< 0,1 µg/L	< 0,1 µg/L	< 0,1 µg/L	0,4 µg/L

Tableau 4-11: Concentrations des molécules trouvées dans les eaux embouteillées en PET et verre de la marque A et B après 10 jours d'exposition à la lumière du soleil

	Eau minérale plate (A)		***Eau minérale gazeuse (B)***	
	PET	***Verre***	***PET***	***Verre***
2,4-di-*tert*-butylphénol	< 0,3 µg/L	< 0,3 µg/L	< 0,3 µg/L	< 0,3 µg/L
Formaldéhyde	< 3,5 µg/L	< 3,5 µg/L	9,7 µg/L	< 3,5 µg/L
Acétaldéhyde	< 2 µg/L	< 2 µg/L	48,1 µg/L	< 2 µg/L
Sb	1,0 µg/L	< 0,2 µg/L	2,0 µg/L	< 0,2 µg/L
Pb	< 0,1 µg/L	< 0,1 µg/L	< 0,1 µg/L	0,3 µg/L

Chapitre 5: ETUDE TOXICOLOGIQUE DES EAUX EMBOUTEILLEES EN PET

L'analyse bibliographique, réalisée dans la section 1.6, a mis en évidence que l'évaluation de la toxicité des mélanges de composés dans l'eau embouteillée en PET a été réalisée en utilisant des tests *in vitro* mesurant différents « *endpoints* » en toxicologie:

- ***La cytotoxicité:*** (capacité d'une substance à provoquer une lésion cellulaire) qui a été évaluée par Sauvant *et al.*(1995) au moyen du test de synthèse de l'ARN et par Evandri *et al.* (2000) sur la croissance de *l'Allium Cepa*. La cytotoxicité est aussi utilisée au préalable pour les tests de genotoxicité afin d'éviter des « faux positifs ».

- ***La génotoxicité :*** qui est la faculté d'une substance à altérer le matériel génétique. On distingue les effets mutagènes (changements dans la structure du matériel génétique), les effets clastogènes (cassures des chromosomes) et les effets aneugènes (anomalies dans le nombre de chromosomes). Il existe de nombreux tests en toxicologie génétique avec leurs avantages et inconvénients. Divers test ont été utilisés sur les eaux embouteillées avec des modèles procaryotes, eucaryotes et des plantes:
    - Le test de mutation réverse sur des bactéries *Salmonella thyphimurium* (Test d'Ames) réalisé par De Fusco *et al.* (1990) et Monarca *et al.* (1994).
    - Le test des aberrations chromosomiques sur d'*Allium Cepa* (Evandri *et al.*, 2000; Ceretti *et al.*, 2010).
    - Le test de micronoyau sur une plante *Trasdescantia* (Biscardi *et al.*, 2003; Ceretti *et al.*, 2010).
    - Le test des Comètes sur des leucocytes humains (Biscardi *et al.*, 2003; Ceretti *et al.*, 2010).

.

- **Le potentiel perturbateur endocrinien:** un perturbateur endocrinien a été défini par *l'International Programme on Chemical Safety* (ICPS, 2002) comme une substance exogène, ou un mélange de substances exogènes qui altère les fonctions du système endocrinien et qui, par conséquent, cause des effets délétères sur la santé d'un organisme intact, de sa descendance ou de toute une sous-population. L'emploi du terme « perturbateur endocrinien » s'effectue uniquement pour une substance qui a été évaluée *in vivo*. Dans le cadre des études *in vitro*, le terme approprié est potentiel perturbateur endocrinien. Cette différence est due notamment à l'absence des systèmes endocriniens et métaboliques complets des organismes utilisés lors des essais *in vitro.*

  Comme abordé dans l'introduction bibliographique (section 1.6), certains auteurs (Pinto et Reali, 2009; Wagner et Oehlmann, 2009; Wagner et Oehlmann, 2010) ont évalué les effets potentiellement perturbateurs endocriniens dans l'eau en bouteille PET en utilisant des méthodes de screening *in vitro* pour la détection des effets œstrogéniques, tels que :

  - **Le test E-screen** (test de prolifération cellulaire) mis au point à partir des cellules cancéreuses mammaires humaines, MCF-7, riches en récepteurs aux œstrogènes et qui ont la propriété de proliférer en présence d'une substance œstrogènique.

  - **Le test « Yeast estrogen »** mis au point à partir des levures (*Saccharomyces cerevisae*) et basé sur l'induction de la transcription d'un gène rapporteur suite à l'activation d'un récepteur hormonal par sa liaison à une substance exogène (activation transcriptionnelle).

De plus, des tests écotoxicologiques ont été réalisés afin de déterminer l'effet sur la reproduction et/ou la croissance des moisissures (*Alternaria alternata*, *Penicillium citrinum* et *Cladosporium cladosporioides*) et des escargots *(Potamopyrgus antipodarum*) dans l'eau embouteillée en PET (Criado *et al.*, 2005; Wagner et Oehlmann, 2009).

D'une étude à l'autre, il en est ressorti:

- La diversité des tests *in vitro* utilisés et la diversité des souches bactériennes et lignées cellulaires testées et des conditions expérimentales.
- Le manque d'harmonisation des conditions d'exposition des eaux embouteillées (temps, température, exposition solaire) et une diversité des techniques d'extraction et/ou concentration de l'eau pour la réalisation des essais.

L'ensemble de ces facteurs induit une variabilité sur les réponses toxicologiques et entraîne une difficulté à comparer les résultats.

Les études globales reliant la composition chimique des migrats avec une réponse toxicologique de ces mélanges de composés issus du contact avec le matériau polymère sont très peu nombreuses. Lorsque des réponses positives sont observées, il est difficile de les relier à un composé(s) à l'origine de cette présence et à la concentration de ce composé.

Il est important de remarquer que dans le cadre réglementaire européen actuel l'évaluation toxicologique se réalise sur des substances utilisées pour la fabrication des matériaux plastiques destinés au contact alimentaire de façon individuelle. Pour l'instant, la question des éventuelles interactions entre molécules (synergie ou potentialisation d'antagonisme) n'est pas prise en compte.

De ce fait, la réalisation d'une approche globale combinant l'analyse chimique avec des essais toxicologiques s'avère nécessaire. En effet, les résultats issus des essais toxicologiques doivent être corrélés avec les données analytiques. Cette corrélation permet de déterminer si un effet toxique observé est dû à une substance clairement identifiée ou a un effet mélange de ces composés présents dans les migrats (AFSSA, 2006; Severin *et al.*, 2011) voire à des impuretés ou produits de dégradation.

Le présent chapitre est dédié à l'évaluation de la toxicité potentielle de ces mélanges de composés (migrats) issus des bouteilles PET et verre. La particularité de cette étude est que la composition chimique des migrats a été déterminée au préalable. En effet, dans le chapitre 4, les résultats de l'analyse chimique des composés organiques et les traces métalliques présentes dans l'eau embouteillée en PET et ses analogues en verre après exposition à la lumière directe du soleil et à la température on été rapportés.

Dans le cadre de cet étude, nous avons sélectionné une batterie de tests afin d'évaluer la cytotoxicité, la génotoxicité et le potentiel perturbateur endocrinien de nos extraits d'eau embouteillée, des toxicités pouvant s'exprimer à faible concentration. Les tests utilisés et la justification de notre choix ont été exposés dans la section 1.8 du chapitre 1 du présent travail.

Brièvement, nous rappelons les tests toxicologiques employés :

- **Test de cytotoxicité:** test de vitesse de synthèse de l'ARN.
- **Tests de toxicologie génétique:**
    - Test d'Ames.
    - Test du micronoyau.
- **Tests de perturbation endocrinienne:**
    - Potentiel œstrogènique sur le récepteur humain ERα.
    - Potentiel (anti)-androgénique sur le récepteur humain AR.

Dans ce chapitre, tout d'abord seront présentés les échantillons testés et les conditions de préparation de ceux-ci. Ensuite, seront abordés le principe, les conditions expérimentales et les résultats obtenus pour chacun des tests. Pour conclure, les effets toxicologiques observés seront discutés par rapport aux données de la littérature.

5.1 LES ECHANTILLONS D'ESSAI

Les mélanges de substances présentes dans l'eau et issues d'une migration sont en très faible concentration de l'ordre du ng/L. Les techniques d'extraction et de concentration utilisées en chimie analytique ne sont pas forcément adaptées pour la réalisation des essais toxicologiques. En effet, le solvant d'extraction organique employé pour la préparation des échantillons peut affecter la viabilité de cellules (effet solvant) et par conséquent, peut fausser les résultats obtenus.

Comme il a été décrit dans le chapitre 3, nous avons mis au point une méthode multi-résidus pour la quantification des composés relatifs au matériau polymère. L'extraction en phase solide (SPE) a été employée pour extraire et concentrer suffisamment les composés présents dans l'eau embouteillée et ensuite pouvoir réaliser l'analyse des extraits par chromatographie en phase gazeuse (GC-MS). L'acétate d'éthyle a été choisi comme solvant d'extraction. La finalité a été d'utiliser ces mêmes extraits concentrés dans l'acétate d'éthyle de composition connue pour évaluer la toxicité.

Des essais préliminaires de cytotoxicité du solvant ont été effectués afin d'évaluer la concentration la plus élevée pour laquelle la viabilité cellulaire n'est pas affectée. Pour cela, des témoins négatifs constitués uniquement du solvant et le témoin cellulaire sans solvant ont été effectués systématiquement pour chaque test.

Les conditions opératoires de ces tests préliminaires de cytotoxicité et la concentration des extraits dans le milieu cellulaire employés seront détaillées pour chaque essai dans les sections suivantes. Il a été décidé de rechercher un effet toxique des extraits dans l'acétate d'éthyle des eaux embouteillées en PET et verre de la marque A et B exposées aux conditions les plus sévères de température (10 jours à 60°C) et d'irradiation solaire (10 jours d'exposition à la lumière directe du soleil). La justification du choix des marques de bouteilles a été abordée dans la section 1.8.5 et les conditions d'expositions ont été présentées dans la section 4.2 et 4.3.

Ce choix a été fait en considérant que la quantité et la concentration des substances migrant de l'emballage PET vers l'eau serait plus importante dans ces conditions d'exposition maximale.

Il a été décidé que si une réponse toxicologique positive était détectée dans ces conditions extrêmes, il serait ensuite nécessaire de tester les extraits d'eau embouteillée exposée à des conditions plus modérées jusqu'à arriver à la réalisation des essais pour l'eau avant l'exposition (*t = 0 jour*). Dans le tableau ci-dessous, sont indiqués les extraits employés pour l'étude de la toxicité des eaux embouteillée après exposition.

Tableau 5-1: Extraits en acétate d'éthyle des eaux embouteillées en PET et verre après exposition utilisés pour l'étude du potentiel toxique

Codification des extraits dans l'acétate d'éthyle	Volume de l'extrait	Marque des bouteilles	Type d'eau	Matériau de conditionnement	Conditions d'exposition
ApUV	1,4 mL	A	Eau minérale plate	PET	10 jours d'exposition solaire
AvUV				Verre	
BvUV		B	Eau minérale gazeuse	PET	
BpUV				Verre	
ApT	1,4 mL	A	Eau minérale plate	PET	10 jours à 60°C
AvT				Verre	
BpT		B	Eau minérale gazeuse	PET	
BvT				Verre	

Les extraits ont été préparés en suivant le protocole du chapitre 3 pour la méthode multi-résidus. Cependant, les étalons internes déuterés n'ont pas été ajoutés aux échantillons d'eau avant la réalisation de l'extraction par SPE du fait de leur toxicité. L'eau embouteillée en PET et verre a été concentrée avec un facteur 500, à l'exception de l'eau gazeuse conditionnée en verre de la marque B (concentration d'un facteur 375). L'éluat dans l'acétate d'éthyle a été transféré dans un flacon brun de 2 mL fermé avec un bouchon recouvert de papier aluminium afin d'éviter des pollutions dues au matériau plastique du bouchon. Un aliquote de chaque extrait a été prélevé pour être injecté en GC-MS afin de déterminer sa composition. Les extraits ont été stockés au congélateur (-20°C) avant la réalisation des tests toxicologiques.

5.2 TEST DE VITESSE DE SYNTHESE DE L'ARN

Cet essai *in vitro* consiste à déterminer la vitesse d'incorporation d'un traceur radioactif, l'uridine tritiée, dans l'ARN cellulaire. Le potentiel cytotoxique est mis en évidence en mesurant l'inhibition de la vitesse de synthèse de l'ARN dans des cellules d'hépatocarcinome humain (cellules HepG2). La particularité de cet essai est qu'il permet de déterminer un phénomène de morbidité cellulaire antérieur à la mort de la cellule donc un effet précoce (Fauris *et al.*, 1981).

Le protocole de Fauris *et al.* (1985) a été adopté aux cellules HepG2 par Valentin *et al.* (2001b). Les cellules sont traitées avec les échantillons d'essai pendant 20 h dans un milieu de culture. Ensuite, la vitesse de synthèse d'ARN est déterminée en mesurant la vitesse d'incorporation de l'uridine tritiée dans l'ARN cellulaire. Celle-ci suit un profil linéaire pendant au moins 30 minutes et aussi peut-être exprimée sous forme de régression linéaire. La pente obtenue pour les échantillons d'essai est comparée à celle obtenue pour le témoin. En parallèle on utilise une molécule cytotoxique connue validant le bon déroulement du test, c'est-à-dire, un témoin positif.

5.2.1 Matériel et méthodes

5.2.1.1 Le modèle cellulaire et le milieu de culture

La ligne cellulaire HepG2 a été fournie par l'European Collection of Cell Cultures (ECCAC). Les cellules sont cryoconservées (azote liquide) dans le milieu de culture supplémenté par 10% de DMSO. Les cellules HepG2 se caractérisent par une morphologie épithéliale (cf. figure 5-1) Elles sont adhérentes et maintenues en couche monocellulaire.

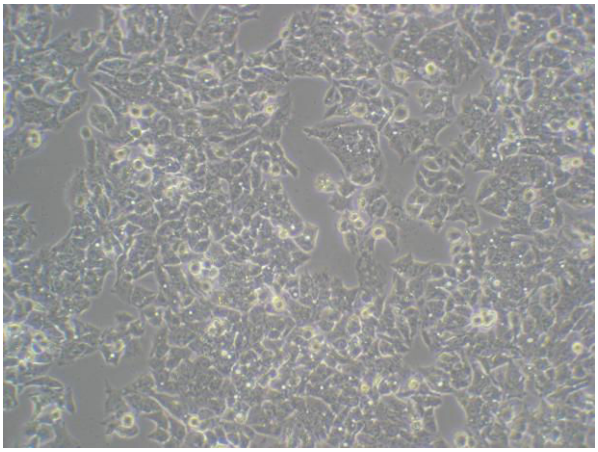


Figure 5-1: Cellules HepG2 utilisées pour cette étude

Le milieu de culture utilisé est le Minimum Essentiel Medium (MEM) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1% d'une solution d'acides aminés non essentiels à 100 % et 2mM de L-glutamine. Durant le traitement des cellules, le pourcentage de SVF est diminué à 0,5% afin d'éviter les interactions avec les échantillons et les molécules à tester. Les cellules sont utilisées sur 10 passages maximum.

5.2.1.2 Les substances témoins

- ***Le témoin négatif*** est le milieu de culture MEM uniquement.
- ***Le témoin solvant*** est l'acétate d'éthyle à 1%, quantité maximale du solvant utilisé dans le milieu de culture (concentration non cytotoxique).
- ***Le témoin positif*** est le dichromate de potassium à 5 µM dans le milieu de culture.

5.2.2 Mode opératoire

Les cellules sont ensemencées dans une microplaque de 96 puits à raison de 50 000 cellules dans 100 µL de milieu par puits. L'incubation est réalisée pendant 28 h à 37°C sous 5% CO_2 par obtenir un tapis cellulaire demi-confluent.

Les cellules sont ensuite traitées avec les échantillons d'essai. Le milieu de culture MEM est remplacé par un milieu de traitement contenant 1 % d'extraits d'eau embouteillée après exposition. Les cellules restent en contact avec le milieu de traitement pendant 20 heures.

Pour chaque échantillon testé, 18 puits de la microplaque sont traités. Chaque cinétique est effectuée sur 6 temps expérimentaux : 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes et pour chaque temps, 3 réplicats sont réalisés.

Il est important de préciser qu'un pH acide dans le milieu de culture peut provoquer un effet cytotoxique donc un résultat dit « faux-positifs ». Pour s'affranchir des ces éventuelles variations, un indicateur, le rouge de phénol, a été ajouté au milieu cellulaire. Le pH extracellulaire (pH = 7,4) est resté constant pendant l'essai.

Après 20 heures de contact entre les cellules et l'échantillon d'essai, la cinétique débute avec l'ajout de l'uridine tritiée dans le milieu de culture cellulaire à raison de 0,3 µCi/puits. L'incorporation de ce composé radioactif est stoppée toutes les 5 min en additionnant 30 µL de dodecylsulfate de sodium (SDS) à 3 % (m/v) afin de lyser les cellules.

Le contenu de chaque puits est déposé dans une microplaque équipée, au fond de chaque puits, d'un filtre. Ce filtre a été prétraité avec 100 µL d'acide trichloracétique (TCA) à 20% (m/v). Cette étape permet d'éliminer l'uridine tritiée en excès, c'est-à-dire non incorporée dans l'ARN.

Les puits, préalablement rincés avec 300 µL d'éthanol, sont séchés avant d'être comptés en scintillation liquide avec 30 µL de MicroScint O (Packard). La radioactivité présente dans chaque puits est proportionnelle à la quantité d'ARN synthétisé et elle est déterminée à l'aide d'un compteur TopCount NXT (Packard Bioscience Company, Meriden).

5.2.3 Interprétation et critères d'acceptation des résultats

La vitesse de synthèse d'ARN (cpm/min) est déterminée par la pente d'une droite obtenue par régression linéaire des valeurs expérimentales. Pour chacun de temps expérimentaux, la moyenne des résultats des trois réplicats est calculée. La droite de régression est tracée à partir des 6 valeurs expérimentales comme présentée à titre d'exemple dans la figure 5-2. Une valeur de 100% est attribuée à la pente des échantillons témoins négatifs (absence de toxicité).

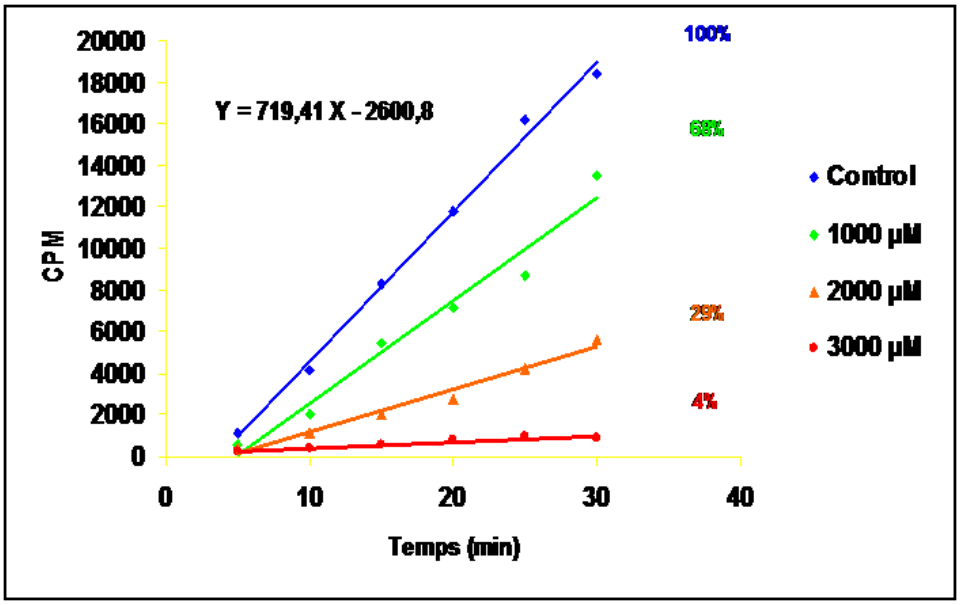


Figure 5-2: Exemple de représentation graphique de la détermination de la vitesse de synthèse d'ARN pour le méthylméthane sulfonate

Des critères d'acceptation ont été fixés afin de valider l'essai:

- Le témoin négatif et le témoin positif doivent être traités en même temps que les échantillons d'essai avec des cellules appartenant au même lot,
- L'ordonnée à l'origine de la pente de droite du témoin négatif doit être négative,
- Le coefficient de corrélation au carré de la droite de régression doit être supérieur ou égal à 0,9 ($R^2 \geq 0,9$),
- La valeur du pourcentage de synthèse d'ARN obtenue pour le témoin positif doit être inférieure à 40%.

De plus, si le pourcentage de synthèse d'ARN obtenu pour l'échantillon d'essai est inférieur à 70 % par rapport à la valeur obtenue pour le témoin, le résultat révèle un effet cytotoxique (Valentin *et al.*, 2001b; Valentin-Severin *et al.*, 2002). Un essai de confirmation est nécessaire.

5.2.4 Résultats et Discussion

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 5-3.

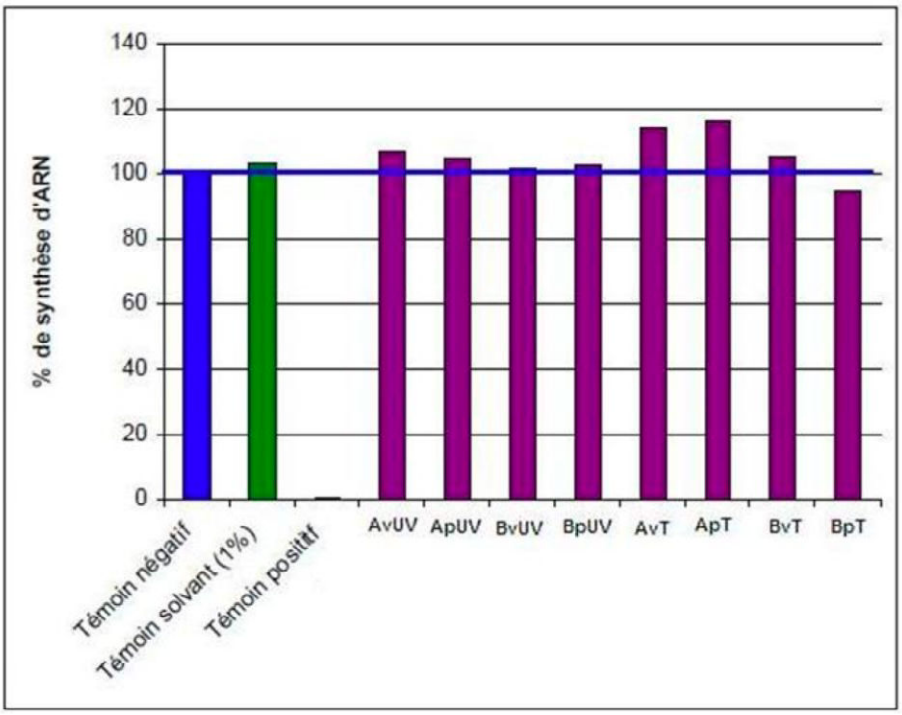


Figure 5-3: Pourcentage de synthèse d'ARN obtenu pour les extraits testés par rapport au témoin négatif (Valentin *et al.*, 2001b)

A l'aide du test de vitesse de la synthèse d'ARN sur des cellules HepG2, les échantillons concentrés en acétate d'éthyle ont été testés après dilution à 1% dans le milieu de culture. Aucune cytotoxicité n'a été mise en évidence pour l'ensemble des extraits concentrés des eaux embouteillées de la marque A (eau plate) et marque B (eau gazeuse) conditionnées en verre et en PET, quelles que soient les conditions d'exposition (à la lumière solaire où à la température).

Les résultats obtenus lors de cette étude concordent avec la réponse négative observée par Sauvant *et al.* (1995) au moyen du même type de test de cytotoxicité. Cependant, la comparaison s'avère difficile compte tenu des différences sur plusieurs paramètres : la lignée cellulaire testée (fibroblastes L929 de murine), les conditions de stockage des bouteilles (température ordinaire pendant 24 mois) et la préparation de l'échantillon (essai de l'eau sans concentration préalable).

Il en ressort que:

- L'utilisation des cellules HepG2 est un modèle humain et donc plus extrapolable à l'Homme que le test réalisé avec des fibroblastes L929 des souris. Par ailleurs, ces cellules du foie originaires d'un hépatocarcinome humain possèdent de nombreuses caractéristiques génotypiques et phénotypiques des cellules hépatiques normales. Elles se caractérisent pour leur capacités métaboliques pour une grande variété de substances cytotoxiques et génotoxiques (Knowles *et al.*, 1980; Knasmüller *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2006).
- Dans cette étude, des extraits d'eau embouteillée concentrés un facteur 5 par rapport à la concentration initial de l'eau ont été testés. Sauvant *et al.* (1995) ont réalisé l'eau directement sans concentration au préalable. Cependant, la même réponse négative a été observée.
- La migration des substances dans l'eau ne présente donc aucune cytotoxicité pour la lignée humaine dans des conditions d'exposition plus longues mais modérées en température (24 mois à température ordinaire) et dans les conditions expérimentales, plus sévères, de cette étude (10 jours à 60°C).

Parallèlement, l'analyse chimique de l'eau embouteillée après exposition a été réalisée par ces mêmes auteurs. Aucune trace de métaux et d'acétaldéhyde n'a été détectée. Dans cette étude, l'analyse des extraits d'acétate d'éthyle a été réalisée. Le 2,4-di-*tert*-butylphénol a été identifié dans l'eau gazeuse embouteillée en PET et verre (bouteilles B) ainsi que seul dans l'eau plate conditionnée en verre (bouteilles A) après 10 jours d'exposition à 60°C des bouteilles. La présence de ce composé suite à l'exposition à la température dans l'eau embouteillée en PET et en verre ne provoquerait pas d'effets cytotoxiques dans ces conditions expérimentales.

Par contre, Sauvant *et al.* (1995) ont montré un effet cytotoxique pour de l'eau distillée en contact avec des granules et des préformes en PET pendant 10 jours à température ordinaire (20-22°C). Dans le cas de préformes, ils ont constaté une augmentation statistiquement significative de l'activité L.D.H. (135 %) et une diminution de réponse au test de vitesse de synthèse de l'ARN qu'il n'a plus retrouvé sur le produit fini. Cependant, comme indiqué dans l'eau embouteillée en PET aucune trace de métaux et d'acétaldéhyde n'ont été détectés. Malgré tout, on ne doit pas écarter la possibilité des migrations d'autres substances non identifiées (impuretés, néoformés, etc.) par les auteurs et par cette étude.

En complément, nous rappelons que le polymère dans les préformes est pratiquement amorphe. Ainsi la migration des constituants du matériau est favorisée par la mobilité des chaînes macromoléculaires. Par contre, pour les bouteilles, la migration se voit fortement diminuée par l'état semi-cristallin du PET. Cette différence de l'état structurale du polymère pourrait expliquer ces résultats.

5.3 TEST DE MUTATION REVERSE SUR DES BACTERIES (TEST D'AMES)

Le test d'Ames permet une évaluation de l'activité mutagène d'une substance dans un modèle procaryote (Ames *et al.*, 1975). La mutagénèse est la première étape du processus cancéreux. Ce test présente une bonne corrélation avec la cancérogenèse, est rapide et très peu couteux. Comme indiqué (section 1.8.4), l'essai est standardisé et préconisé par la ligne directrice de l'OCDE N°471 (révisée et adoptée le 21 juillet 1997). C'est aussi un des tests exigé par *l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments* (EFSA) afin de vérifier l'innocuité des molécules utilisées pour les emballages alimentaires.

L'essai bactérien de mutation réverse est pratiqué sur des souches de *Salmonella typhimurium* auxotrophes à l'égard d'un acide aminé. Le principe de cet essai repose sur la détection de mutations reverses en rétablissant ainsi la capacité fonctionnelle des bactéries à synthétiser un acide aminé essentiel. En effet, les souches d'essai sont porteuses d'une mutation sur le locus de l'histidine (his). Les bactéries révertantes sont détectées d'après leur capacité à se développer en l'absence de l'acide aminé requis par la souche d'essai parentale. En effet, en absence d'histidine dans la gélose nutritive, les souches bactériennes ne peuvent pas se développer. Aucun clone n'est donc observé à l'exception de ceux issue de la croissance spontanée. En présence d'une substance génotoxique, la mutation his- est reversée et un nombre important de colonies va pouvoir pousser même en absence d'histidine (cf. figure 5-4).

En fonction des souches utilisées pour la réalisation du test, différents types de mutations peuvent être détectées. Les informations génétiques des souches de bactéries utilisées dans l'essai sont détaillées dans le tableau 5-2.

Par contre, l'utilisation des systèmes procaryotes implique l'addition d'un système de métabolisation exogène de type S9 (extrait de foie de rongeurs) due à l'absence d'activité enzymatique de ce modèle procaryote.

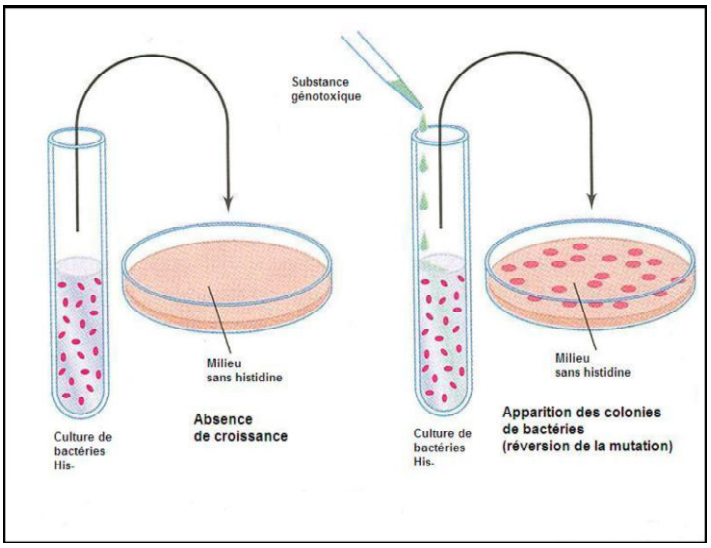


Figure 5-4: Illustration de la mise en évidence de la réversion de la mutation sur des bactéries d'après Madigan et Martinko (2007)

La majorité des molécules mutagènes nécessitent une bioactivation qui se fait dans l'organisme. Le système d'activation métabolique permet de distinguer les mutagènes directs des mutagènes nécessitant une induction (mutagènes indirects). Cet extrait enzymatique métabolise les substances en dérivés électrophiles, plus susceptibles de réagir avec l'ADN. En effet, la plupart des substances chimiques deviennent mutagènes une fois métabolisées par le corps humain. Cette mutagénèse est induite par un changement de la structure chimique de la substance initialement inactive. Ces changements interviennent au niveau du foie par un processus de phase I et/ou phase II. Ainsi, l'OCDE préconise que l'agent génotoxique doit être testé en présence et en absence de ce système d'activation afin d'éviter de « faux-négatifs ». Le système d'activation métabolique utilisé pour ce test est présenté dans la section 5.3.1.3.

5.3.1 Matériel et méthodes

5.3.1.1 Les souches de bactéries

Le test d'Ames a été pratiqué sur deux souches de *Salmonella typhimurium* auxotrophes au regard de l'histidine: TA98 et TA100 (Ames *et al.*, 1975). Ces deux souches ont été sélectionnées pour les raisons suivantes:

- Elles permettent de détecter une plus large gamme de mutagènes,
- Chaque souche bactérienne est spécifique pour la détection d'un type de mutation (frameshift pour TA98 et substitution des bases pour TA100).

Tableau 5-2: Génotype spécifique des souches TA98 et TA100

Souches	***Gènes affectés***	***Mutations additionnelles***		***Plasmide***	***Type de mutation détectée***
		Réparation	*LPS*		
TA98	hisD3052	uvrB-	rfa-	pKM101+	Frameshift
TA100	hisG46	uvrB-	rfa-	pKM101+	Substitution d'une paire de base

La souche TA98 met en évidence une mutation de type Frameshift. Ce type de mutation consiste en l'insertion ou délétion des paires de bases dans les codons triplets qui constituent le code génétique contenu dans la séquence de l'ADN. Cette modification entraîne un décalage du cadre de lecture pour tous les codons situés en avènement ce qui implique des changements majeurs dans la synthèse de protéines. La souche TA100 est capable de détecter une mutation générée par la substitution d'une paire de base purique ou pyrimidique. Cette mutation se produit dans la séquence codante d'un gène. Ce changement va se répercuter dans toute la séquence primaire du produit encodé par ce gène (Madigan et Martinko, 2007).

Les mutations additionnelles dans les souches TA98 et TA100 sont les suivantes:

- ***La mutation uvrB-***: consiste en l'élimination des systèmes de réparation de l'ADN pour des dommages provoqués par certaines substances mutagènes et la lumière UV.

- ***La mutation rfa-***: entraîne une modification de la membrane externe de la bactérie qui est composée essentiellement de lipopolysaccharides (LPS), ce qui implique une augmentation de la perméabilité cellulaire à certains types de substances chimiques. Cette mutation est sensible au cristal violet.

De plus, la présence du plasmide pKM101 (molécule d'ADN extrachromosomique) dans les deux souches apporte une augmentation des processus induisant des erreurs lors de la réparation de l'ADN.

- **Origines et stockage congelé des souches**

Les souches *Salmonella typhimurium* du laboratoire de Toxicologie Alimentaire ont été obtenues auprès de M. Ames au département de Biochimie de l'Université de Californie (Berkeley, USA). Un stock congelé des souches d'essai est obtenu par addition du DMSO (0,09 mL/mL de culture) dans une culture fraîche de bactéries. Les souches d'essai sont aliquotées et ensuite, congelées à -80°C.

5.3.1.2 Préparation des cultures bactériennes

- **Inoculum**

Les cultures fraîches de bactéries d'essai sont préparées la veille au soir. Un aliquote décongelé est repiqué dans un flacon contenant du bouillon nutritif qui permet aux bactéries de croître.

L'inoculum est placé dans un agitateur/incubateur (120 ± 20 g, 37 ± 2°C) jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance des bactéries qui est aux alentours de 10^9 cellules / mL.

- **Contrôle des caractères génétiques**

Les mutations présentes dans une aliquote choisi des souches TA98 et TA100 sont contrôlées comme indiqué ci-dessous :

- <u>*Contrôle de la mutation his⁻*</u> : cette mutation est testée par étalement de culture fraîche des bactéries sur des géloses nutritives en présence et en absence d'histidine. La croissance de souches est dépendante de la présence de cet acide aminé : il y a donc croissance en présence d'histidine et absence de croissance si celui-ci n'est pas présent.

- *Contrôle de la mutation rfa⁻* : comme expliqué dans la section 5.3.1.1, les souches de *S. typhimurium* présentant une mutation rfa sont sensibles au cristal violet. Une aliquote fraîche des bactéries est étalé sur de la gélose nutritive. Un disque contenant 10 µg de cristal violet est ensuite ajouté. Une inhibition de la croissance cellulaire autour du disque montre la présence de ce type de mutation dans les souches bactériennes.
- *Contrôle de la mutation uvrB-* : Les souches de *S. typhimurium* présentant cette mutation sont sensibles à la lumière UV. Une aliquote de culture fraîche de bactéries est étalée sur de la gélose nutritive. La moitié de la gélose contenant les bactéries est irradiée en utilisant une lampe UV à 254 nm. La croissance des souches sur la gélose est présente seulement dans la partie exposée à l'irradiation.
- *Contrôle du Plasmide pKM101* : la confirmation de la présence de plasmide dans les souches bactériennes se réalise en testant leur résistance à l'ampicilline. Cela permet de vérifier la présence de PKM101 mais pas l'absence de contamination. Une aliquote de culture fraîche est étalée sur de la gélose nutritive. Un disque contenant 10 µg d'ampicilline est ajouté sur la gélose. Aucune zone d'inhibition de la croissance cellulaire n'apparaît autour du disque pour des bactéries possèdent le plasmide pKM101.

5.3.2 Le système d'activation métabolique

Le système utilisé dans nos conditions expérimentales est une fraction post-mitochondriale préparée à partir des foies de rats mâles Sprague-Dawley commercialisée par Trinova Biochem (Allemagne). Les rats ont préalablement été traités avec une combinaison de deux inducteurs enzymatiques : la phénobarbitone et la β-naphthoflavone. Cette fraction post-mitochondriale est utilisée à une concentration habituelle de 10% (v/v) dans le mélange S9. La composition du S9 mix est détaillée dans le tableau 5-3.

Tableau 5-3: Composition du système d'activation métabolique (S9 mix)

Composants	Concentration finale
Tampon phosphate, pH 7,4	100 mM
Glucose-6-phophate	5 mM
Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP)	4 mM
Chlorure de potassium (KCl)	33 mM
Dichlorure de magnésium ($MgCl_2$)	8 mM
Fraction S9	10 % (v/v)

5.3.2.1 Les substances témoins

L'OCDE établit que des témoins négatifs et positifs, spécifiques des souches employées, doivent être utilisés dans chaque essai afin de démontrer la validité du test. Ces témoins doivent être testés en présence et en absence de S9 mix.

Deux ***témoins négatifs*** ont été donc utilisés:

- ***Le témoin sans solvant*** qui est constitué uniquement du milieu de culture des bactéries.
- ***Le témoin solvant est l'acétate d'éthyle*** utilisé pour la préparation de nos échantillons d'eau. En effet, le solvant utilisé pour l'essai ne doit pas altérer la survie des souches bactériennes, être mutagène ou modifier l'activité du système d'activation métabolique S9. Pour s'assurer que le solvant est complètement inactif vis-à-vis des bactéries, un test de cytotoxicité préliminaire a été mis en place (section 5.4.2.1). L'objectif de cet essai est de déterminer la quantité maximale de solvant pouvant être testée dans le test de mutagénicité. Les conditions opératoires et les résultats du test de cytoxicité du solvant sont rapportés dans la section 5.3.2.1.

En ce qui concerne ***les témoins positifs***, différentes substances ont été utilisées en fonction de la souche bactérienne et de la présence ou l'absence de l'activation métabolique S9 dans le test de mutagénèse.

Tableau 5-4: Principales caractéristiques des témoins positifs pour les souches TA98 et TA100 en absence et en présence de S9

	Souches testées	Nom de la substance (abréviation)	N°CAS	Pureté (%)	Quantité (µg/boîte)
Absence de S9	TA 98	2-nitrofluorène (2-NF)	607-57-8	98	1,0 µg
	TA 100	azide de sodium (AS)	26628-22-8	>99,5	1,0 µg
Présence de S9	TA 98	2- aminoanthracène (2-AA)	613-13-8	96	2,5 µg
	TA 100	2- aminoanthracène (2-AA)	613-13-8	96	2,5 µg

5.3.3 Conditions expérimentales

Dans cette partie, le protocole utilisé pour la réalisation du test préliminaire de cytotoxicité du solvant et le test de mutagénicité des échantillons seront présentés. Dans les deux cas, les suspensions de bactéries ont été traitées avec l'acétate d'éthyle (témoin négatif) et/ou les extraits des échantillons d'eau en présence et en absence d'un système d'activation métabolique (S9 mix). La méthode d'incorporation directe dans les boîtes de Pétri par étalement a été employée. Dans un tube à essai, les suspensions bactériennes sont mélangées avec une couche d'agar puis une quantité déterminée de l'extrait est ajoutée. Le mélange est déposé par étalement sur un milieu minimum dans une boîte de Pétri.

5.3.3.1 Test de cytotoxicité du solvant

Comme indiqué précédentement, l'objectif de cet essai préliminaire est de déterminer quelle est la quantité d'acétate d'éthyle maximale pouvant être employée pour l'essai de mutagénicité, sans avoir d'effets cytotoxiques. Des quantités croissantes d'acétate d'éthyle: 10, 25, 50, 100 µL ont été testées selon la méthode standard sur gélose, avec et sans activation métabolique, sur la souche d'essai TA 100 parce que c'est la plus sensible. Chaque quantité est testée dans trois boîtes de Pétri.

La cytotoxicité est détectée par une réduction du nombre de révertants spontanés, un éclaircissement ou une diminution du tapis bactérien. Les résultats des tests de cytotoxicité sont présentés dans la section 5.3.4.1.

5.3.3.2 Test de mutagénicité

Comme cela a été indiqué, les essais ont été réalisés par la méthode d'étalement sur gélose avec et sans activation métabolique. Deux souches de *S. typhimurium* TA98 et TA100 sont testées avec différentes quantités des substances d'essai.

Le protocole de l'essai est le suivant:

1. Traitement des bactéries avec la substance d'essai dans des tubes contenant 2,0 mL de gélose de recouvrement sont ajoutés.

- ***Essai en absence d'activation métabolique:***
  - Des quantités croissantes de la substance d'essai: de 10 à 50 µL.
  - 100 µL de culture bactérienne fraîche, contenant aux alentours de 10^8 cellules viables.
  - 500 µL de tampon phosphate à pH 4,7 stérile (100mM).

- ***Essai en présence d'activation métabolique:***
  - Des quantités croissantes de la substance d'essai: de 10 à 50 µL.
  - 100 µL de culture bactérienne fraîche.
  - 500 µL du mélange d'activation métabolique contenant 10% (v/v) de la fraction S9 (cf. tableau 5-3).

Le contenu des tubes est mélangé et versé sur la surface d'un milieu minimal gélosé. Pour une bonne estimation de la variation, chaque concentration de la substance d'essai est testée dans trois boîtes de Pétri différentes. La perte expérimentale d'une boîte n'invalide pas l'essai (OCDE, 1997).

2. Incubation: avant incubation on laisse la gélose de recouvrement se solidifier. Toutes les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 48 h.

3. Comptage: Après le période d'incubation, le nombre de colonies révertantes de chaque boîte est compté pour les échantillons et les témoins négatifs (traitées ou non avec solvant) et les témoins positifs.

5.3.4 Interprétation et validation des résultats

Une substance est considérée mutagène dans ces conditions expérimentales quand:

- La moyenne des colonies révertantes est deux fois supérieure à celle du témoin négatif.
- Il est démontré l'existence d'une augmentation du nombre de révertants de manière dose-dépendante ou du nombre de colonies par boîte à une ou plusieurs concentrations pour au moins une souche avec ou sans activation métabolique.

Des résultats positifs indiquent que la substance conduit à des mutations ponctuelles par substitution de bases (TA 100) ou par un décalage de cadre de lecture du génome (TA 98) de *S. typhimurium*.

5.3.5 Résultats et Discussion

Dans cette section, les résultats du test préliminaire de cytotoxicité du solvant seront présentés. Ensuite, ceux obtenus dans l'essai de mutation réverse pour les extraits des eaux embouteillées en PET et verre après exposition à la lumière solaire et à la température.

5.3.5.1 Résultats des essais de cytotoxicité du solvant

Les résultats des essais de cytotoxicité du solvant (acétate d'éthyle) sont répertoriés dans la tableau 5-5. Les volumes d'acétate d'éthyle suivants: 10, 25, 50 et 100 µL ont servi à évaluer la cytotoxicité du solvant sur de souches TA 100 en présence et en absence de système d'activation métabolique S9.

Tableau 5-5: Résultats des essais de cytotoxicité de l'acétate d'éthyle sur la souche TA100 en absence et en présence du système d'activation métabolique S9

Souches	S9	Quantité acétate d'éthyle//boite	Nombre moyen de révertants par boite	Tapis de fond	Conclusion
TA100	-	10 µl	133	Normal	Non cytotoxique
TA100	-	25 µl	135	Normal	Non cytotoxique
TA100	-	50 µl	123	Normal	Non cytotoxique
TA100	-	100 µl	98	Plus clair	Début cytotoxicité
TA100	-	Témoin sans solvant	135	Normal	conforme aux contrôles historiques
TA100	+	10 µl	118	Normal	Non cytotoxique
TA100	+	25 µl	108	Normal	Non cytotoxique
TA100	+	50 µl	120	Normal	Non cytotoxique
TA100	+	100 µl	106	Normal	Non cytotoxique
TA100	+	Témoin sans solvant	120	Normal	conforme aux contrôles historiques
TA100	+	Témoin positif	724	Normal	conforme aux contrôles historiques

Le témoin sans solvant et le témoin positif testés sur les souches TA100 avec et sans S9 se sont avérés conformes aux contrôles historiques du laboratoire de Toxicologie Alimentaire.

Dans les conditions d'essai, un volume de 100 µL d'acétate d'éthyle sur les bactéries sans activation métabolique S9 a montré un éclaircissement du tapis de fond et une diminution du nombre de révertants par boîte, donc un début de cytotoxicité pour les bactéries. Par contre, le même volume testé (100 µL) sans activation métabolique S9 s'est avéré non cytotoxique. Par ailleurs, l'acétate d'éthyle utilisé jusqu'à 50 µL en présence et en absence d'activation métabolique S9 n'a pas montré de signes de cytotoxicité (tapis de fond normal) sur les souches TA100.

A partir des ces résultats, il a été décidé de tester trois volumes non cytotoxiques (10, 25 et 50 µL) d'extraits des eaux embouteillées dans l'acétate d'éthyle pour la réalisation du test d'Ames.

5.3.5.2 Résultats des essais de mutagénicité

L'ensemble des résultats obtenus pour les extraits des eaux embouteillées PET et verre des marques A et B après exposition solaire et exposition à la température sont présentés dans les tableaux 5-6 et 5-7.

Tableau 5-6: Résultats des extraits des eaux embouteillées en PET et en verre exposés à la lumière solaire pendant 10 jours

Extraits	Volume testé (µL/boîte)	Indice de mutation (IM)			
		Souche TA 98		Souche TA 100	
		Absence de S9	*Présence de S9*	*Absence de S9*	*Présence de S9*
ApUV	10	0,9	0,8	1,0	0,9
	25	1,2	0,7	0,7	1,0
	50	1,1	0,6	0,9	0,9
AvUV	10	1,0	0,4	1,3	1,3
	25	1,1	0,8	1,1	1,2
	50	1,1	0,6	1,0	1,0
BpUV	10	0,9	0,9	0,9	1,0
	25	0,8	0,8	0,9	0,9
	50	1,0	0,7	1,0	0,9
BvUV	10	1,0	0,7	1,0	0,9
	25	0,9	0,7	1,0	0,8
	50	0,8	0,8	0,9	0,8

Tableau 5-7: Résultats des extraits des eaux embouteillées en PET et en verre étuvés à 60°C pendant 10 jours

Echantillons	Volume testé (µL/boîte)	Indice de mutation (IM)			
		Souche TA 98		Souche TA 100	
		Absence de S9	*Présence de S9*	*Absence de S9*	*Présence de S9*
ApT	10	0,9	0,8	0,8	1,0
	25	1,2	0,7	0,9	1,0
	50	1,1	0,6	1,0	0,9
AvT	10	1,0	0,4	1,3	1,2
	25	1,1	0,8	0,9	1,1
	50	1,1	0,6	1,5	1,1
BpT	10	0,9	0,9	0,9	1,2
	25	0,8	0,8	0,9	1,0
	50	1,0	0,7	1,0	0,9
BvT	10	1,0	0,7	1,0	1,2
	25	0,9	0,7	0,8	1,0
	50	0,8	0,8	0,8	1,0

Dans tous les essais réalisés en présence et en absence de S9, les résultats des témoins négatifs sont conformes aux valeurs historiques du laboratoire de Toxicologie Alimentaire (OCDE n°471, 1997) et dans l'ensemble, l'indice de mutation (IM) pour le témoin négatif est d'environ 1,0.

Comme indiqué auparavant, les extraits sont déclarés mutagènes si leur IM est > 2. L'indice de mutation (IM) obtenu est inférieur à 2 pour l'ensemble des résultats, en présence et en absence d'activation métabolique S9, quelles que soient les conditions d'exposition (lumière solaire ou température) et quel que soit le matériau d'emballage (PET ou verre). Dans les conditions expérimentales, les extraits des eaux embouteillées testées ne sont donc pas mutagènes pour les souches bactériennes TA 98 et TA 100 de *S. typhimurium.*

Ces résultats sont en accord avec l'absence d'activité mutagénique d'une eau gazeuse embouteillée en PET après exposition à la lumière solaire pendant 1, 3 et 6 mois montré par Monarca *et al.* (1994). Les bactéries ont été traitées avec des extraits concentrés par SPE au moyen des cartouches C18. A l'inverse, dans cette étude une concentration avec des cartouches Oasis HLB a été réalisée. Par conséquent, la composition chimique des extraits peut être différente avec l'étude menée par Monarca *et al.* (1994). Ces mêmes auteurs n'ont pas réalisé l'analyse chimique des extraits concentrés utilisés pour la réalisation du test d'Ames. Néanmoins, la même réponse négative a été trouvée dans le présent travail.

Contrairement à cette étude, De Fusco *et al.* (1990) ont observé une activité mutagénique deux fois plus élevée dans des extraits concentrés d'eau embouteillée en PET exposée à la lumière solaire pendant 1 mois par rapport aux mêmes conditions d'exposition dans l'obscurité. Cependant, cette réponse positive a été observée seulement pour la souche TA98 testée avec activation métabolique (S9). L'eau a été concentrée au moyen des cartouches C18 en suivant la procédure décrite par (Monarca *et al.*, 1985a; Monarca *et al.*, 1985b).

Comme pour les auteurs précédents, certainement la composition chimique est différente de celle de notre étude due à l'utilisation des cartouches différentes pour la réalisation de la SPE. Les cartouches C18 utilisées par ces auteurs pourraient avoir une capacité de rétention supérieure des molécules mutagéniques que les cartouches Oasis HLB utilisées dans cette étude. Par ailleurs, Wagner et Oehlmann (2010) ont rapporté que les cartouches C18 étaient les plus efficaces pour extraire des molécules à caractère œstrogénique par rapport à d'autres phases adsorbantes (Isolute ENV+, Bakerbond SDB, Oasis HLB, etc.). De plus, la polarité du solvant d'extraction a un impact sur l'élution des composés retenus dans l'adsorbant. Monarca *et al.* (1985a) ont utilisé un solvant polaire (méthanol) et dans cette étude, l'acétate d'éthyle qui est apolaire a été employé. Malheureusement, la composition chimique des extraits n'a pas été déterminée par ces auteurs donc la comparaison avec les molécules détectées dans cette étude (c.f. chapitre 4) s'avère impossible.

5.4 TEST DU MICRONOYAUX

Comme indiqué précédemment, l'essai *in vitro* du micronoyau fait objet de la ligne directrice OCDE n° 487 depuis le 22 juillet 2010 (OCDE n°487, 2010). Le principe de ce test est de mettre en évidence et de comptabiliser la présence de micronoyaux dans des cellules ayant préalablement été exposées à des substances génotoxiques et ayant subi un cycle de mitose. Les micronoyaux sont des entités nucléaires, séparés du noyau principal de la cellule, au sein du cytoplasme cellulaire (cf. figure 5-5). Ils sont constitués de chromosomes entiers ou de fragments acentriques d'ADN résultant de modifications structurales, spontanées ou expérimentales pendant la division cellulaire.

Cet essai permet de détecter des composés chimiques ayant des effets clastogènes (cassures des doubles brins du chromosome) ou/et des effets aneugènes (dysfonctionnement du fuseau mitotique et changement du nombre de chromosomes).

Figure 5-5: Exemple de micronoyau observé dans une cellule binucléée.

Les deux mécanismes de formation des micronoyaux sont représentés dans la figure 5-6. Au moment de la télophase, le fragment de chromosome ou le chromosome entier n'ayant pas migré normalement sur le fuseau mitotique, forme alors un micronoyau. Ces micronoyaux représentent donc des dommages transmissibles aux cellules filles (Kirsch-Volders *et al.*, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2011).

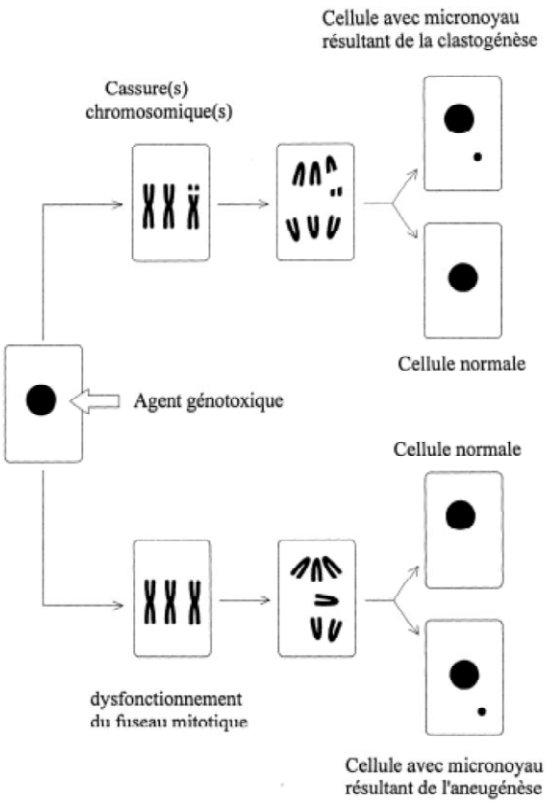


Figure 5-6: Représentation des deux mécanismes de formation des micronoyaux, conséquences d'effets clastogènes et d'effets aneugènes, d'après Fenech (2000) et Foltete (2010)

Dans le cadre de cet essai plusieurs lignées cellulaires peuvent être utilisées. L'OCDE n°487 recommande l'emploi de lymphocytes primaires du sang périphérique humain et des lignées cellulaires issus des rongeurs tels que CHO, V79, CHL/IU et L51784. Néanmoins, il possible d'avoir recours à d'autres types de cellules en justifiant leur performance dans l'essai.
Dans le présent travail, les produits génotoxiques sont mis en évidence par les micronoyaux qu'ils induisent dans le cytoplasme des cellules HepG2 binucléées (Knasmüller *et al.*, 2004). Le protocole expérimental de cette étude est le *« cytokinesis-block micronucleus »*.

L'extrait en acétate d'éthyle d'eau embouteillée à étudier est traité par incubation des cellules HepG2 en présence de cytochalasine B. Cette substance inhibe la cytokinèse, c'est-à-dire, la division du cytoplasme cellulaire pour former des cellules filles après la division du noyau. La présence des deux noyaux dans les cellules permet de vérifier que les cellules testées ont bien subi un cycle de mitose et donc que les concentrations utilisées ne sont pas cytotoxiques et peuvent être comptabilisées (Fenech, 2000).

Si la substance d'essai induit une augmentation statistique significative du nombre des micronoyaux par rapport au taux spontané, on considère l'échantillon comme génotoxique (aneugène et/ou clastogène). Les critères pour l'interprétation et la validation des résultats sont détaillés dans la section 5.4.4.

Les risques d'obtenir des « faux positifs » ne correspondant pas à d'effets génotoxiques peuvent avoir lieu due à des variations importantes du pH dans le milieu cellulaire (OCDE n°487, 2010). En général, l'addition d'une solution tampon dans la culture cellulaire ou le suivi du pH au cours de l'essai avec un indicateur (rouge de phénol), comme réalisé dans cette étude, permet de s'affranchir des effets cytotoxiques.

L'avantage de ce test, outre que la détection d'effets aneugènes et clastogènes, est que la mutation observée est une mutation établie, c'est-à-dire, la mitose des cellules est effectuée avant observation des résultats, donc les cellules filles vont hériter de cette mutation. Néanmoins, ce test est long à réaliser (5 jours) et à lire.

5.4.1 Réactifs et produits

5.4.1.1 Le modèle cellulaire et les conditions de culture

Le modèle cellulaire a été présenté dans la section 5.2.1.1. Le milieu de culture pour les cellules HepG2 est du MEM contenant de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) (10%), des acides aminés non essentiels et de L-glutamine (2mM). Lors des 44 h de traitements, le pourcentage de SVF est diminué à 0,5 % pour éviter les interactions avec l'extrait à tester.

5.4.1.2 Les substances témoins

- ***Le témoin négatif*** est l'acétate d'éthyle. Le solvant a été dilué à 1% dans le milieu de culture. Cette concentration est non-cytotoxique pour les cellules (cf. section 5.2).
- ***Le témoin positif*** est nécessaire pour démontrer que les cellules utilisées, et le protocole d'essai, s'est bien déroulé et donc de prouver la validité du test (OCDE n°487, 2010) . Le témoin positif est une solution de vinblastine sulfate (N°CAS : 143-67-9). Cette molécule a été mise en solution dans du DMSO à 0,005 mM, puis a été diluée au millième dans le milieu de traitement pour avoir une concentration finale de 0,005 µM.

5.4.2 Mode opératoire

Le protocole d'essai comprend les étapes suivantes:

- **Ensemencement des cellules HepG2**: les cellules sont ensemencées en plaque de 6 puits à raison de 750 000 cellules/puits (dans 3 mL). Elles sont ensuite incubées 24 h à 37°C et sous 5 % de CO_2.
- **Traitement des cellules avec les extraits en acétate d'éthyle de nos échantillons**: comme indiqué, les cellules HepG2 sont traitées avec les extraits dans l'acétate d'éthyle au moyen d'une dissolution dans le milieu de culture à hauteur de 1%. Au même temps, la cytochalasine B est ajoutée au traitement à une concentration de 4,5 µg/mL afin de permettre la division du noyau des cellules uniquement. Parallèlement, un témoin négatif (l'acétate d'éthyle à 1%) et un témoin positif de référence (cf. 5.4.1.2) sont également effectués. La cytochalasine B est ajoutée conjointement au traitement (1,5 mL de milieu de culture / puits) à une concentration finale de 4,5 µg/mL de façon à ce que le noyau des cellules se divise mais pas leur cytoplasme. La durée d'incubation des cellules est de 44 heures à 37°C.

- **Récolte des cellules:** une fois le traitement fini, le milieu de culture des cellules est remplacé pour un milieu complet. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 heure et demie. La récolte des cellules se fait par décollement de celles-ci par l'action de la trypsine- Na-EDTA à 0,25 % / 1 mM.
- **Fixation des cellules et préparation des lames :** les cellules sont fixées en deux temps avec un mélange acide acétique/méthanol puis étalées sur lame pour être colorées avec l'orange d'acridine, composé qui émet une fluorescence différente selon qu'il colore de l'ADN (jaune) ou le cytoplasme (rouge) (cf. figure 5-7).

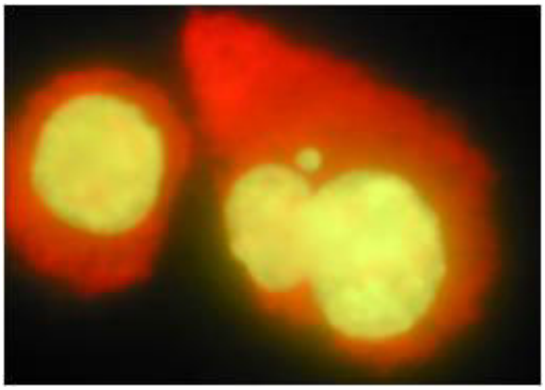


Figure 5-7: Exemple de cellules HepG2 colorées par l'orange d'acridine

- **Comptage des cellules binucléées:** toutes les lames y compris celles des témoins négatif et positif, sont examinées au microscope optique. Le pourcentage de cellules binucléées est déterminé sur 1000 cellules afin de mesurer la cytotoxicité des échantillons.

5.4.3 Traitement des résultats

Les comptages des micronoyaux ne sont valables que pour une gamme allant de concentrations d'une cytotoxicité nulle ou légère à une cytotoxicité maximale de 55 ± 5%.

- **Premier comptage des cellules**

Un premier comptage de 1000 cellules viables est réalisé afin de déterminer le pourcentage de cellules avec un, deux ou plusieurs noyaux. Cette première approche permet de définir l'indice de prolifération CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index) qui s'exprime de la façon suivante:

CBPI = [nombre de cellules mononuclées + (2 × nombre de cellules binucléées) + (3 × nombre de cellules plurinucléées)] / nombre de cellules comptées au total.

L'indice de prolifération est calculé pour chaque échantillon testé ainsi que pour les témoins positif et négatif. A partir des valeurs obtenues de CBPI, la mesure du pourcentage de cytotoxicité est calculée à partir de l'expression:

% de cytotoxicité = 100 – 100 [(CBPI testé – 1) / (CBPI témoin négatif – 1)]

- **Second comptage des cellules**

Cette seconde lecture permet d'estimer le nombre de micronoyaux (*MN*) présents dans un minimum de 2000 cellules binucléées (*BNC*) par concentration testée. Dans la mesure du possible, la fréquence des micronoyaux doit être évaluée au minimum dans 1000 cellules par lame. Le comptage est exprimé en micronoyaux par 1000 cellules binucléées (MN/1000 BNC).

Les critères listés par Kirsch-Volders *et al.* (2000) ont été appliqués pour l'identification des micronoyaux :

- Le micronoyau doit avoir un diamètre inférieur à un tiers du noyau principal.
- Le micronoyau doit être bien séparé du noyau principal, c'est-à-dire, l'identification entre les frontières nucléaires doit être claire sans chevauchement entre le micronoyau et le noyau principal.
- La coloration doit être la même entre le micronoyau et le noyau principal.

5.4.4 Interprétation et validation des résultats

Deux critères ont été fixés afin de décider du potentiel mutagène des échantillons testés. Ces critères sont les suivants:

- Le premier est basé sur la significativité biologique. Le produit est mutagène s'il génère une augmentation supérieure ou égale à deux fois la valeur du témoin négatif.
- Le second est basé sur la significativité statistique. Les résultats sont traités statistiquement par un test ANOVA suivi d'un test de Newman-Keuls. La différence est déclarée comme significative quand $p < 0,05$.

De plus, en ce qui concerne l'interprétation des résultats, la ligne directrice N°487 de l'OCDE établit que le pourcentage de cytotoxicité calculée pour l'ensemble des échantillons d'essai doit rester inférieur à 55%. En dessous de cette valeur, les résultats obtenus peuvent être analysés sans risque de faux positifs dus à cause d'un effet cytotoxique de la substance testée.

5.4.5 Résultats et Discussion

Les résultats sont présentés dans la figure 5-8.

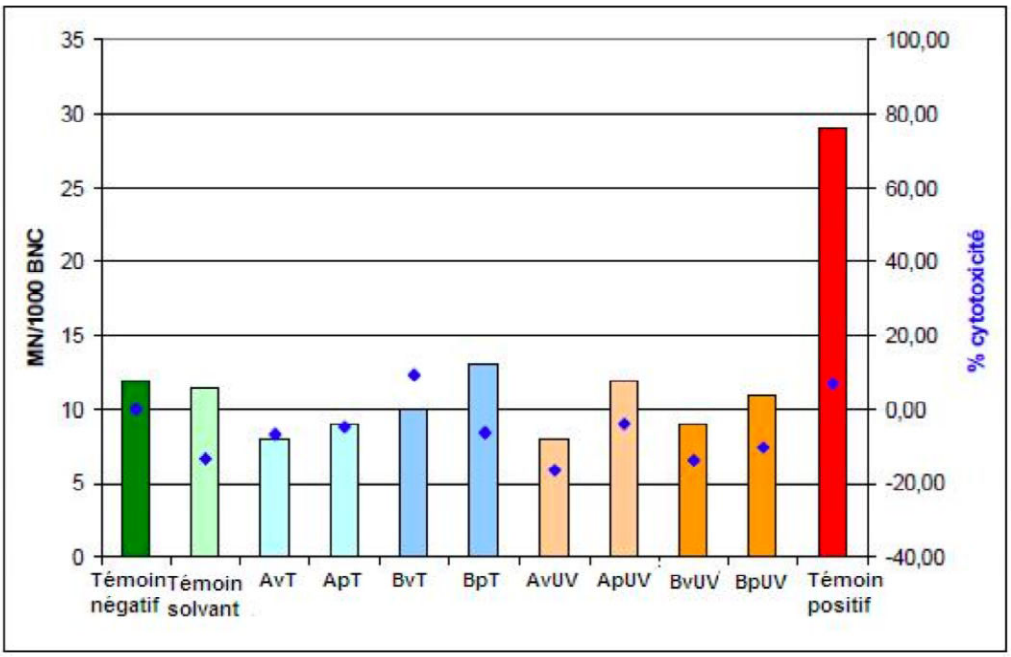


Figure 5-8: Résultats obtenus dans le test du micronoyau sur la lignée cellulaire HepG2 avec les extraits des eaux embouteillées des marques A et B en bouteille PET et verre après 10 jours d'exposition à la lumière solaire et 10 jours d'exposition à une température de 60°C

La validité de l'essai est démontrée par la significativité biologique du témoin positif qui se traduit par une augmentation du nombre de micronoyaux (d'environ 2 fois par rapport au témoin négatif) dans les cellules binucléées (% de cytotoxicité de 75 et 29 micronoyaux / 1000 cellules binucléées).

Les extraits des eaux conditionnées en PET et en verre de la marque A (eau plate) et marque B (eau gazeuse), quelles que soient les conditions d'exposition (lumière solaire et température), n'ont pas montré d'augmentation significative du nombre de micronoyaux dans les cellules binucléées HepG2. Le taux de cytotoxicité calculé pour l'ensemble des extraits testés reste inférieur à la valeur maximale de 55 % (OCDE n°487, 2010). Les échantillons ne sont donc pas génotoxiques pour les cellules HepG2.

D'après la littérature et comme montré dans la synthèse bibliographique:

En ce qui concerne l'impact de la température sur l'eau embouteillée en PET, Ceretti *et al.* (2010) n'ont pas observé non plus de réponse positive dans le test de micronoyau réalisé sur un hydride de *Tradescantia* (plante supérieure). Même si pour certaines eaux plates conditionnées en PET et en verre exposées pendant 10 jours à 40°C, une augmentation entre 5 et 8 fois du nombre des micronoyaux a été détectée par rapport à l'eau distillée (témoin négatif). Cette augmentation n'était pas biologiquement significative.
A l'inverse, le test de micronoyau sur *Tradescantia* réalisé par Biscardi *et al.* (2003) a montré une augmentation 8 fois supérieure de la fréquence des micronoyaux au bout de 2 mois de stockage d'une eau minérale plate embouteillée en PET par rapport à l'eau distillée. Une légère augmentation des micronoyaux a été également trouvée dans les eaux minérales plates stockées pendant 3 mois et dans les eaux gazeuses stockées pendant 1, 3 et 9 mois.
Ceretti *et al.* (2010) ont montré une augmentation des micronoyaux sur *Allium cepa* pour l'eau gazeuse en bouteille PET mais aussi en bouteille verre après avoir subi les mêmes conditions de stockage que pour les tests réalisé sur *Tradescantia.* Ainsi ces mêmes auteurs dans le test de Comètes sur des leucocytes humaines réalisé sur des extraits concentrés d'eau n'ont pas observé d'augmentation significative des dommages sur l'ADN dans l'eau carbonatée comparée avec l'eau plate après stockage pendant 10 jours à 40°C.

Par ailleurs, il est intéressant d'évoquer que Biscardi *et al.* (2003) ont aussi utilisé le test de Comètes pour évaluer la génotoxicité. L'analyse du nombre de cellules donnant des valeurs de percentile supérieures à 95% par rapport à un témoin négatif (DMSO) a montré que les cellules hautement endommagées présentant des différences significatives correspondaient aux eaux minérales plates et gazeuses stockées pendant 1, 3, 4, 9 et 12 mois dans des bouteilles PET.

Comme auparavant rapporté par Ceretti *et al.* (2010) ces divergences de résultats peut être fonction des tests (test du micronoyaux et test des comètes) et des modèles cellulaires (*Allium Cepa*, *Tradescantia*, leucocytes humains) utilisés pour évaluer la génotoxicité. Leur pertinence pour l'étude du potentiel génotoxique de l'eau est discutée dans la section a) qui suit.

En ce qui concerne l'effet de l'exposition solaire sur l'eau embouteillée, une augmentation de 2 fois des aberrations chromosomiques sur *Allium cepa* sur l'eau embouteillée en PET par rapport a l'eau embouteillée en verre exposées à la lumière directe du soleil pendant 16 semaines a été observée par Evandri *et al.* (2000). Cependant, étant donné le petit nombre d'échantillons testés, les résultats ne sont que peu représentatifs.

La comparaison des résultats de cette étude par rapport aux réponses obtenues des autres travaux s'est avérée complexe à cause de plusieurs facteurs:

a) La diversité des tests et des modèles cellulaires utilisés

Les tests du micronoyau rapportés par la littérature sont basés sur des modèles cellulaires appartenant à des plantes supérieures : *Allium Cepa et Tradescantia* (Evandri *et al.*, 2000; Biscardi *et al.*, 2003; Ceretti *et al.*, 2010). Comme il a été évoqué par Ceretti *et al.* (2010), ce type d'essai sur *Tradescantia* se réalise en trempant les inflorescences directement dan l'eau embouteillée. Ce traitement permet de tester directement la génotoxicité des éventuels composés volatils présents dans l'eau. Cependant, les modèles végétaux ne sont pas considérés comme des outils de « screening » primaire extrapolables aux mammifères par les lignes directrices internationales.

Des modèles cellulaires d'origine humaine, tels que des leucocytes, des lymphocytes du sang et dans cette étude, des cellules d'hépatocarcinome humaine ont été employés (Ergene *et al.*, 2008; Ceretti *et al.*, 2010). Cependant, l'évaluation de la génotoxicité sur ces cellules a été effectuée par différents tests qui détectent des « *endpoints* » différents : le test de Comètes et le test du micronoyau. Comme indiqué, le test de micronoyau permet de mettre en évidence des effets clastogènes (pertes de fragments de chromosomes) et des effets aneugènes (changements du nombre de chromosomes) pendant la division cellulaire.

Le test de Comètes permet de détecter des dommages primaires de l'ADN. Ce test est basé sur la capacité des fragments d'ADN chargés négativement à migrer à travers un gel d'agarose en réponse à une champ électrique. Les fragments d'ADN sont produits suite à des dommages de types cassures simples et doubles brins et des sites alkali-labiles causés par l'exposition à des composés génotoxiques (Kumaravel *et al.*, 2009).

Ce test présente de multiples avantages comme sa sensibilité, sa reproductibilité et sa faisabilité avec un petit nombre de cellules (entre 400 et 2000 cellules).

Le principal inconvénient de ce test est qu'il n'est pas spécifique pour la génotoxicité (Rurdell *et al.*, 2003). En effet, son principe est basé sur la détection des cassures des brins d'ADN. Bien que des effets génotoxiques sont à l'origine des ce phénomène, il est capable de mettre en évidence les cassures des brins d'ADN formées dans les processus de mort cellulaire (l'apoptose) ou bien ces cassures peuvent également être formées transitoirement au cours des systèmes de réparation de l'ADN.

b) Le contrôle du pH et la présence de CO_2 dans les échantillons d'essai

La ligne directrice de l'OCDE établit des recommandations pour la standardisation du test du micronoyau. Cette ligne directrice prévient des risques d'obtenir des résultats « faux positifs » dus à une variation trop importante en cours d'essai des facteurs comme le pH, l'osmolarité ou la survie cellulaire. Il a été constaté que certains types d'eaux minérales, notamment les eaux gazeuses ont un pH légèrement acide. Cet essai doit se dérouler dans un milieu neutre pour éviter un effet cytotoxique sur les cellules à cause du pH acide. Ce milieu peut s'obtenir par addition d'une solution tampon dans le milieu de culture. Comme précédemment indiqué, dans cette étude l'évolution du pH en cours d'essai a été suivie avec un indicateur (le rouge de phénol) et aucune variation n'a été observée.

De plus, la présence de CO_2 dans l'eau est aussi une source des résultats « faux positifs » ne dépendant pas des effets génotoxiques. C'est pour cette raison qu'un dégazage de l'eau s'avère indispensable avant le traitement des cellules avec celle-ci. Ce phénomène a été constaté par Ceretti *et al.* (2010) en réalisant un essai Microtox® sur une eau gazeuse. Les auteurs ont observé que l'eau carbonatée était toxique pour les bactéries, mais que l'élimination du CO_2 faisait disparaître cette toxicité. Du même Jondeau *et al.* (2006) ont fait les mêmes observations.

c) Les conditions d'extraction utilisées pour obtenir les échantillons sont très variées d'une étude à une autre

En effet, la composition des extraits testés dépend de la technique utilisée pour la préparation de l'eau. Biscardi *et al.* (2003) pour la réalisation du test de micronoyau et les tests de Comètes ont concentré l'eau (un facteur 10 et un facteur 50) par lyophilisation et puis rédissolution avec une quantité d'eau distillée adéquate. A notre connaissance, cette technique est rarement utilisée pour la concentration de l'eau. Le principal avantage est qu'elle permet d'éviter un endommagement des cellules contrairement aux solvants organiques utilisés pour concentrer les échantillons.

Evandri *et al.* (2000) et Ceretti *et al.* (2010) ont testé l'eau directement pour la réalisation de test de micronoyau sur l'*Allium Cepa* et sur *Tradescandia.* De plus, Ceretti *et al.* (2010) pour la réalisation des tests de Comètes ont travaillé avec des extraits dans le DMSO obtenus par SPE (cartouches C18). Les principales caractéristiques des cartouches C18 ont été abordées dans la section 3.1.3.

Dans cette étude, les eaux embouteillées d'essai ont été concentrées au moyen de la SPE (cartouches Oasis HLB) et puis diluées dans le milieu de culture à 1% pour la réalisation du test du micronoyau (facteur de concentration de 5 par rapport à la concentration initiale de l'eau embouteillée). Comme il a été montré dans les essais de cytotoxicité, la dilution à 1 % des extraits en acétate d'éthyle des eaux embouteillées dans le milieu de culture est non cytotoxique pour les cellules.

En matière d'analytique, seuls Biscardi *et al.* (2003) et Ceretti *et al.* (2010) ont quantifié certains composés dans l'eau embouteillée. Ceretti *et al.* (2010) n'ont pas détecté de traces d'acétaldéhyde ou plastifiants (DEHP et DBP) dans l'eau plate et gazeuse embouteillée en PET après exposition pendant 10 jours à 40°C. Dans la présente étude, les extraits d'eau plate et gazeuse embouteillées en PET après 10 jours d'exposition solaire et d'exposition à 60°C, ne révèlent pas de traces de DBP et DEHP. A l'inverse, Biscardi *et al.* (2003) ont détecté une concentration non négligeable (3,2 mg/L) de DEHP dans ces extraits issus de la lyophilisation de l'eau, ce qui pourrait être due à une pollution de la verrerie utilisée pour cette technique de préparation de l'eau. Néanmoins, le DEHP est une substance non génotoxique (Butterworth *et al.*, 1984; Dybing, 2002), donc en aucun cas, il serait à l'origine de l'activité génotoxique observée par les auteurs. Par ailleurs, comme précédemment indiqué, le test de Comètes n'est pas spécifique de la génotoxicité. Les conclusions doivent donc être prises avec précaution.

5.5 LE POTENTIEL PERTURBATEUR ENDOCRINIEN

Les substances type perturbateur endocrinien causent des effets néfastes sur la santé chez les organismes et/ou sur sa descendance par suite de désordres du système endocrinien et modification de la fonction hormonale. Le système endocrinien regroupe un ensemble de glandes et de cellules produisant des hormones, lesquelles contrôlent de nombreuses fonctions physiologiques. Les xénobiotiques interfèrent sur la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'activité où l'élimination des hormones naturelles agissant sur l'homéostasie, la reproduction, le développement ou le comportement des organismes (Kavlock *et al.*, 1996; Desmots *et al.*, 2005).

Les premiers effets de la perturbation endocrinienne ont été mis en évidence sur des espèces animales (oiseaux, reptiles, poissons et mammifères) exposées à ce type de molécules par l'environnement (Guillette *et al.*, 1994; Facemire *et al.*, 1995; Scholz et Klüver, 2009) et des observations du même ordre ont été montrés chez l'Homme, bien que la relation dose-effet ne soit pas totalement établie. Les effets nocifs potentiels chez l'Homme sont nombreux : puberté précoce, réduction du nombre de spermatozoïdes, système de reproduction altéré, obésité, comportement sexuel modifié et augmentation des cancers de seins, ovaires, testicules et prostate (NRC, 1999; Kabuto *et al.*, 2004; Newbold *et al.*, 2004; Della Seta *et al.*, 2006; Patisaul *et al.*, 2006; Patisaul *et al.*, 2009).

Les substances à caractère perturbateur endocrinien peuvent se classer selon leur origine en composés d'origine naturelle (mycotoxines, phytoœstrogène, etc.) et composés d'origine chimique (pesticides, herbicides, métaux lourds, etc.). Les denrées alimentaires peuvent être contaminées pour ces substances lors leur production, transformation et conditionnement. Une liste non exhaustive de ces substances à effet perturbateur endocrinien et susceptibles de d'être trouvées dans les aliments est exposée sur le tableau 5-8.

Tableau 5-8: Molécules à caractère perturbateur endocrinien susceptibles d'être trouvés dans les denrées alimentaires (Dumont, 2010)

CONTAMINATION AU COURS DE LA PRODUCTION				
Les contaminants naturels				
Phyto-œstrogènes		Myco-œstrogènes	Hormones naturelles	
Isoflavones (génisteine, daidzéine) Lignanes (entérodiole, entérolactone) Stilbènes (resvératrol) Coumestanes (coumestrol, 4-méthoxycoumestrol)		Zéaralenone et ses métabolites	(Présence dans la viande, le poisson, les produits laitiers)	
Les contaminants chimiques				
Pesticides	Métaux lourds*	Autres POP	Médicaments	Autres
Atrazine Chlordane Chlordécone o,p'-DDT HCB HCH Lindane Vinchlozoline Aldrine Dieldrine Endosulfan Fenveralate Permethrin Endrine Toxaphène Mirex (101 au total (Pesticide Action Network UK, 2009)	Cadmium Aluminium Plomb Chrome Antimoine Barium Lithium * également d'origine naturelle	PCB (aroclor) Dioxines (TCDD) Furanes	Diéthylstilbestrol Ethinylestradiol Hormones de croissance Flutamine Anti-inflammatoires	Alkyphénols HAP Resorcinol Phénol Phénylphénol Thiocyanate Vinylacétate Ethylène glycol Benzène Toluène Styrène Parabènes Tributylétain
CONTAMINATION AU COURS DE LA TRANSFORMATION				
3-monochloropropane-1,2-diol				
CONTAMINATION AU COURS DU CONDITIONNEMENT				
Bisphénol A Bisphénol F Phthalates Benzophénone 4-nonylphénol Semicarbazide (néoformé)				

La particularité des perturbateurs endocriniens est qu'ils agissent à très faibles doses. Les deux mécanismes d'action des ces substances ont été décrits:

- ***Un mode d'action direct:*** qui consiste en la liaison et l'interaction du perturbateur endocrinien avec les récepteurs hormonaux stéroïdiens: œstrogéniques, androgéniques et thyroïdiens. Les récepteurs aux œstrogènes ERα et β sont particulièrement concernés par ce mécanisme. La liaison des substances type perturbateur endocrinien sur les ER comporte un effet œstrogènique par activation du récepteur qui ensuite va se lier à l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE). A l'inverse, un effet anti-œstrogènique peut aussi avoir lieu dû à une perturbation de la liaison sur le ER sur cette même séquence et en empêchant la liaison des hormones naturelles.
- ***Un mode d'action indirect:*** qui consiste en tout autre mécanisme qui n'implique pas une liaison avec des récepteurs stéroïdiens. Par exemple, en interférant avec la production, le stockage, le transport, le métabolisme, la libération, la sécretion et l'élimination des hormones naturelles.

L'évaluation du potentiel œstrogénique et anti-androgénique des eaux embouteillées a été effectuée. En effet, le potentiel œstrogénique de certaines substances présentes dans les emballages destinés au contact alimentaire a été déjà mis en évidence. C'est le cas du bisphénol A (BPA) et du bisphénol F (BPF) constituants des emballages en polycarbonate (PC) et des résines époxydes (Hiroi *et al.*, 1999; Stroheker *et al.*, 2004; Cabaton *et al.*, 2009). De même certains phtalates (benzylbutylphtalate, bis-2-ethylhexylphtalate, etc.) utilisés comme plastifiants, notamment pour les emballages en polychlorure de vinyl (PVC) (Stroheker *et al.*, 2005; Takeuchi *et al.*, 2005) ont aussi des potentiels perturbateurs endocriniens *in vitro*. De plus, Sohoni et Sumpter (1998) ont rapporté que des molécules ayant un faible potentiel œstrogénique peuvent être aussi anti-androgéniques. En effet, certaines études ont montré des effets anti-androgéniques du BPA (Xu *et al.*, 2005) et des phtalates (Stroheker *et al.*, 2005) sur différents modèles *in vitro* animaux et/ou humains.

Les tests d'activation transcriptionnelle du potentiel œstrogénique et (anti)androgénique ont été utilisés dans cette étude pour évaluer le potentiel perturbateur endocrinien des extraits d'eau embouteillée en PET et en verre après exposition solaire et à la température. Ces tests sont basés sur l'induction de la transcription d'un gène rapporteur suite à l'activation d'un récepteur hormonal par une substance et à sa liaison sur les éléments de réponse de l'ADN.

Dans cette étude, les activités œstrogénique et (anti)-androgénique ont été testées par activation directe du récepteur humain aux œstrogènes (ERα) et du récepteur humain aux androgènes (AR), respectivement. Les tests du potentiel perturbateur endocrinien œstrogènique et (anti)androgénique ont été réalisés sur des cellules HepG2 et sur des cellules MDA-MB453-kb2, transitoirement ou stablement tranfectées, respectivement. La transfection a été effectuée avec un plasmide portant les séquences d'ADN d'un élément de réponse à une hormone (HRE) couplé à un gène rapporteur comme celui de la luciférase.

Les principaux avantages de ces tests sont la rapidité d'obtention des résultats fiables et reproductibles et la possibilité de discriminer des agonistes et des antagonistes. Les tests sont très sensibles et sont recommandés par le *Centre Européen pour la Validation des Méthodes Alternatives* (ECVAM).

Dans les sections qui suivent seront détaillées les conditions opératoires des tests du potentiel perturbateur endocrinien œstrogènique et (anti)androgénique avec les résultats pour les extraits des eaux embouteillées en PET et en verre après exposition à la lumière solaire et à la température (60°C) pendant 10 jours.

5.6 TEST DU POTENTIEL PERTURBATEUR ENDOCRINIEN ŒSTROGENIQUE

L'évaluation de l'effet œstrogénique des extraits des eaux embouteillées a été réalisée par un test d'activation transcriptionnelle sur la lignée cellulaire HepG2 selon le protocole de Dumont (2010). Cette ligne cellulaire permet de mesurer la capacité d'une substance à induire l'activation de l'expression du gène luciférase médiée par le récepteur humain aux œstrogènes (ERα).

Les cellules ont été transfectées de façon transitoire avec trois plasmides. Un premier plasmide contenant le gène du récepteur aux œstrogènes (plasmide hERα). Un deuxième plasmide portant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de l'élément de réponse aux œstrogènes (plasmide ERE-TK-Luc). Enfin, un troisième plasmide permettant d'évaluer l'efficacité du processus de transfection (plasmide pCMVβGal).

5.6.1 Matériel et méthodes

5.6.1.1 Réactifs et produits

Les différents réactifs et produits chimiques utilisés pour la réalisation de l'essai sont répertoriés dans le tableau 5-9.

Tableau 5-9: Réactifs et produits chimiques utilisés pour la réalisation du test du potentiel perturbateur endocrinien œstrogénique

Produits (abréviation)	Fournisseur
Minimum essentiel medium (MEM)	Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
Sérum de veau fœtal (SVF)	Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
Glutamine 200 mM	Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
Tampon phosphate sodium (PBS)	Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
OptiMem	Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
Trypsine EDTA 0,05%	Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
Chlorure de magnésium ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Acides aminés non essentiels (AANE)	Sigma-Aldrich(Saint Quentin Fallavier, France)
17β-œstradiol (17βE2)	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Réactif de lyse (RLB 5X)	Promega (Charbonnières-les-Bains, France)
Luminol	Promega (Charbonnières-les-Bains, France)
Rouge de chlorophénol β-d-galactopyranoside (CPRG)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Allemagne)
Réactifs du tampon phosphate	Merck (Lyon, France)
Réactifs de Bradford	BioRad (Munich, Allemagne)
Exgen	Euromedex (Mundolsheim, France)

5.6.1.2 Modèle cellulaire

Les essais d'activation transcriptionnelle par liaison au récepteur des œstrogènes ont été réalisés sur le même modèle cellulaire que celui présenté dans la section 5.2.1.1. La culture des cellules est réalisée sur une surface de 75 cm^2 dans un flacon de culture (Dustcher, Brumath) dans un milieu minimum essentiel (MEM). Ce milieu est supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine et 1 % d'acides aminées non essentiels (AANE). Les cellules sont incubées à 37°C sous 5% de CO_2 dans une étuve et le milieu est renouvelé toutes les 48 h. Ces cellules sont utilisées sur 10 passages maximum.

5.6.1.3 Les substances témoins

Des témoins négatifs et positifs ont été utilisés afin de vérifier la validité de l'essai.

- ***Le témoin négatif:*** le témoin négatif est l'acétate d'éthyle à une concentration non-cytotoxique de 0,2%. Cette concentration en solvant sera la même dans tous les puits traités, quelle que soit la concentration en extraits.
- ***Le témoin positif:*** le témoin positif est le 17β-œstradiol à la concentration de 0,1 nM.

5.6.2 Mode Opératoire

5.6.2.1 Ensemencement des cellules

Les cellules HepG2 sont ensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 120 000 cellules par puits dans un milieu MEM sans rouge de phénol qui a des propriétés œstrogéniques (Ortmann *et al.*, 1990). Le milieu est supplémenté en 10% d'AANE, 1% de glutamine 200mM et 10 % de SVF destéroïdé selon le protocole de Soto *et al.* (1992), afin d'éviter toute interaction avec les stéroïdes éventuellement contenus dans le SVF. Les cellules sont mises en culture pendant 24 h.

5.6.2.2 Transfection transitoire des cellules.

La transfection consiste en l'introduction de l'ADN exogène dans les cellules. La transfection a été réalisée selon le protocole décrit par Gasnier *et al.* (2009). Les plasmides utilisés pour la réalisation de la transfection transitoire des cellules HepG2 sont ERα, ERE-TK-Luc, pCMVβGal et PsG5.

- **Le plasmide ERα** encode le récepteur œstrogènique humain α et il a été obtenu à partir du plasmide pRST-ER possèdant un promoteur issu d'un virus du Sacome de Rous (Hall et McDonnald, 1999).
- **Le plasmide ERE-TK-Luc** contient le gène codant de la luciférase sous le contrôle de l'élément de réponse aux œstrogènes.
- **Le plasmide pCMVβGal** contient le gène de la β-galactosidase (β-gal). Ce gène s'exprime de manière non inductible. Il est utilisé par vérifier l'efficacité de la transfection et pour normaliser l'activité de la luciférase.
- **Le plasmide pSG5** est employé pour obtenir la concentration adéquate d'ADN pour la transfection (Cabaton *et al.*, 2009).

L'Exgen 500 est un réactif de lipofection. Il contient les liposomes pour l'introduction de l'ADN exogène dans les cellules.

Lors de l'étape de transfection, les mélanges des plasmides (ADN extrachromosomique) sont préalablement réalisés:

- Le mix 1 contient 100 ng de plasmide (ERE-TK-Luc ou ERα), du NaCl 15 M à 3% et l'eau milliQ stérile en qsp pour avoir 1 µL par puits.
- Le mix 2 est préparé en ajoutant le mix 1 contenant ERα au mix 1 contenant ERE-TK-Luc puis 100 ng de pCMVβGal, 200 ng de pSG5 et du NaCl 0,15M en qsp pour avoir 15 µL par puits.
- Le mix 3 est préparé indépendamment avec 2 µL d'Exgen 500 et du NaCl 0,15 M en qsp pour avoir 15 µL par puits.

Le mix 3 est déposé sur le mix 2 puis fortement agité pour éviter la formation de complexes de taille trop importante pour la transfection. Le tout est laissé à incuber pendant 10 min à température ambiante puis ajouté à du milieu optiMEM en quantité suffisante pour avoir 300 µL par puits.

Chaque puits de la microplaque est vidé et le milieu de transfection est déposé à raison de 300µL/puits dans la microplaque contenant les cellules HepG2. La microplaque est ensuite incubée pendant 1 h à 37°C sous 5 % de CO_2.

5.6.2.3 Traitement des cellules

Après 1 h d'incubation, le milieu OptiMEM est remplacé par 1 mL de milieu de traitement MEM sans rouge de phénol, supplémenté en AANE (1%), L-glutamine (1%) sans SVF. Ce milieu de traitement contient :

- soit le témoin négatif (acétate d'éthyle à une concentration de 0,2 %),
- soit le témoin positif (17β-œtradiol à 0,1 nM),
- soit les extraits des échantillons d'eau aux quantités non cytotoxiques de 0,05 %, 0,1 % et 0,2 %.

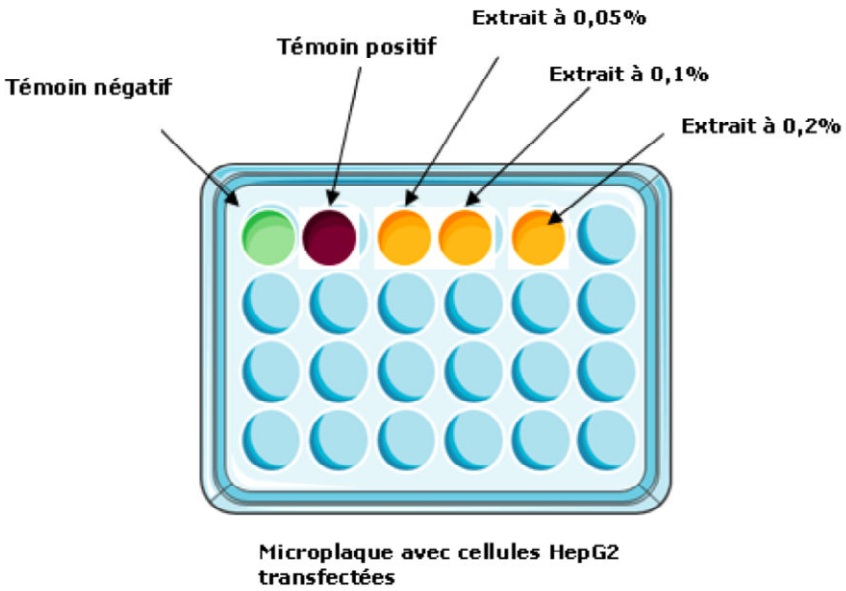


Figure 5-9: Disposition du milieu de traitement dans la microplaque avec les cellules HepG2 transfectées

La microplaque est incubée à 37°C sous 5% de CO_2 pendant 24h et ensuite les puits sont vidés par aspiration et les cellules HepG2 sont lysées avec 100 µL de RLB 5X. La lyse consiste à détruire la membrane cellulaire afin de libérer le contenu du cytoplasme. La microplaque est placée au congélateur à -80°C pendant 20 min. Ensuite, les puits sont grattés pour récupérer la totalité des lysats qui sont transférés dans des microtubes.

Les lysats sont soumis à trois cycles de congélation (-80°C) et décongélation (au bain marie à 37°C). Puis ils sont centrifugés avant de réaliser les dosages de la luciférase, de la β-galactosidase et des protéines.

5.6.2.4 Dosages

L'activité transcriptionnelle des échantillons est déterminée à partir de trois dosages différents.

- ***Le dosage de la luciférase:*** consiste à mesurer l'activité enzymatique de la luciférase en ajoutant dans le milieu son substrat, la luciférine. La mesure de cette activité se traduit par la capacité d'un ligand du récepteur aux œstrogènes à initier la transcription du gène rapporteur. Ce dosage est réalisé en mélangeant 10 µl du lysat avec 50µL de luciférase. La lecture de l'intensité lumineuse générée est réalisée avec un luminomètre TopCountNXT (Packard Bioscience Company, Meriden).

- ***Le dosage de la β-galactosidase:*** permet de mesurer les variations d'efficacité de la transfection par puits. L'activité enzymatique de la β-Gal est déterminée en ajoutant son substrat, le chlorophenol-red-β-d-galactopyranoside (CPRG), dans les lysats, ce qui génère un chlorophénol de couleur rouge. La mesure par colorimétrie est réalisée sur un spectrophotomètre Chameleon V (Hidex, ScienceTec, Courtaboeuf) à une longueur d'onde de 570 nm.
- ***Le dosage de protéines totales:*** permet de déterminer les variations du nombre de protéines par puits. La mesure est réalisée selon la méthode Bradford (Bradford, 1976) en utilisant un spectrophotomètre Chamaleon V (Hidex, ScienceTec, Courtaboeuf) à une longueur d'onde de 595 nm.

L'expression qui illustre l'activité transcriptionnelle est le résultat de l'activité de la luciférase multipliée par le ratio entre la concentration des protéines et l'activité de la β-galactosidase. Les résultats obtenus par les échantillons d'essai sont comparés à la réponse observée du 17β-œstradiol à 0,1nM (témoin positif). La réponse du témoin positif est arbitrairement fixée à 100 %.

5.6.3 Résultats expérimentaux

5.6.3.1 Résultats des extraits des eaux embouteillées en PET et verre de la marque A et B exposées à 60°C pendant 10 jours

Les résultats de l'activité transcriptionnelle pour les extraits de l'eau embouteillée en PET et verre, après exposition pendant 10 jours à 60°C, sont représentés sur la figure 5-10. Comme auparavant indiqué, les extraits des échantillons dans l'acétate d'éthyle ont été dilués dans le milieu de culture aux concentrations non cytotoxiques de 0,05 %, 0,1 % et 0,2 %. La dilution à 0,2 % dans le milieu de culture correspond à la concentration initiale de l'eau embouteillée avant l'extraction en phase solide (SPE).

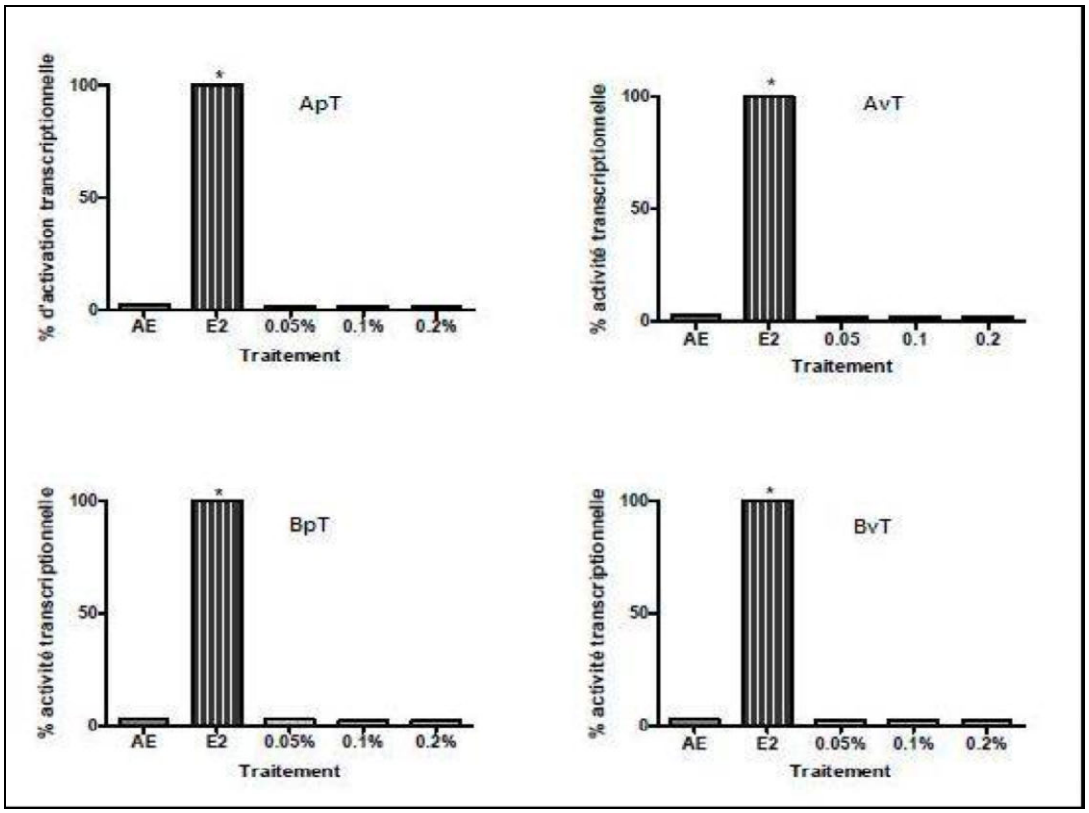


Figure 5-10: Activités transcriptionnelles des différents extraits de l'eau exposée à 60°C pendant 10 jours liés au récepteur ERα. Les cellules HepG2 transfectées transitoirement par ERα et ERE-TK-Luc sont traitées aux concentrations indiquées pendant 24h. L'activité maximale (100%) correspond à l'activité obtenue avec du 14β-œstradiol (E2) à la concentration 0,1 nM (environ 4 200 000 cps). L'activité transcriptionnelle des extraits et du contrôle négatif, acétate d'éthyle (AE) à 0,25 % dans le milieu, a été calculée par rapport au contrôle positif (E2). Le signe * indique des résultats statistiquement différents du témoin. Les valeurs représentées sont les moyennes de trois expériences indépendantes (3 puits par concentration)

L'activité transcriptionnelle du témoin positif, le 17β-œstradiol, s'est avérée active et sa réponse a été fixée à 100%. Le témoin négatif (l'acétate d'éthyle) à la concentration non-cytotoxique de 0,25% a été testé dans le milieu de culture.

Dans ces conditions expérimentales, aucune augmentation significative de l'activité transcriptionnelle n'a été observée, quelle que soit la marque des bouteilles et le type de matériau utilisé pour le conditionnement de l'eau. Aucun effet œstrogènique lié au récepteur ERα n'a donc été observé après exposition des bouteilles d'eau à des conditions élevées en température (10 jours à 60°C).

5.6.3.2 Résultats des extraits des eaux embouteillées en PET et verre de la marque A et B exposées à la lumière solaire directe pendant 10 jours

Les pourcentages d'activité transcriptionnelle liées au récepteur ERα obtenues pour les échantillons de la marque A et de la marque B d'eau embouteillée en verre et en PET sont représentés sur la figure 5-11.

Les extraits des échantillons dans l'acétate d'éthyle ont été dilués dans le milieu de culture aux concentrations non cytotoxiques de 0,05 %, 0,1 % et 0,2 %. La dilution à 0,2 % dans le milieu de culture correspond à la concentration initiale de l'eau embouteillée avant l'extraction en phase solide (SPE).

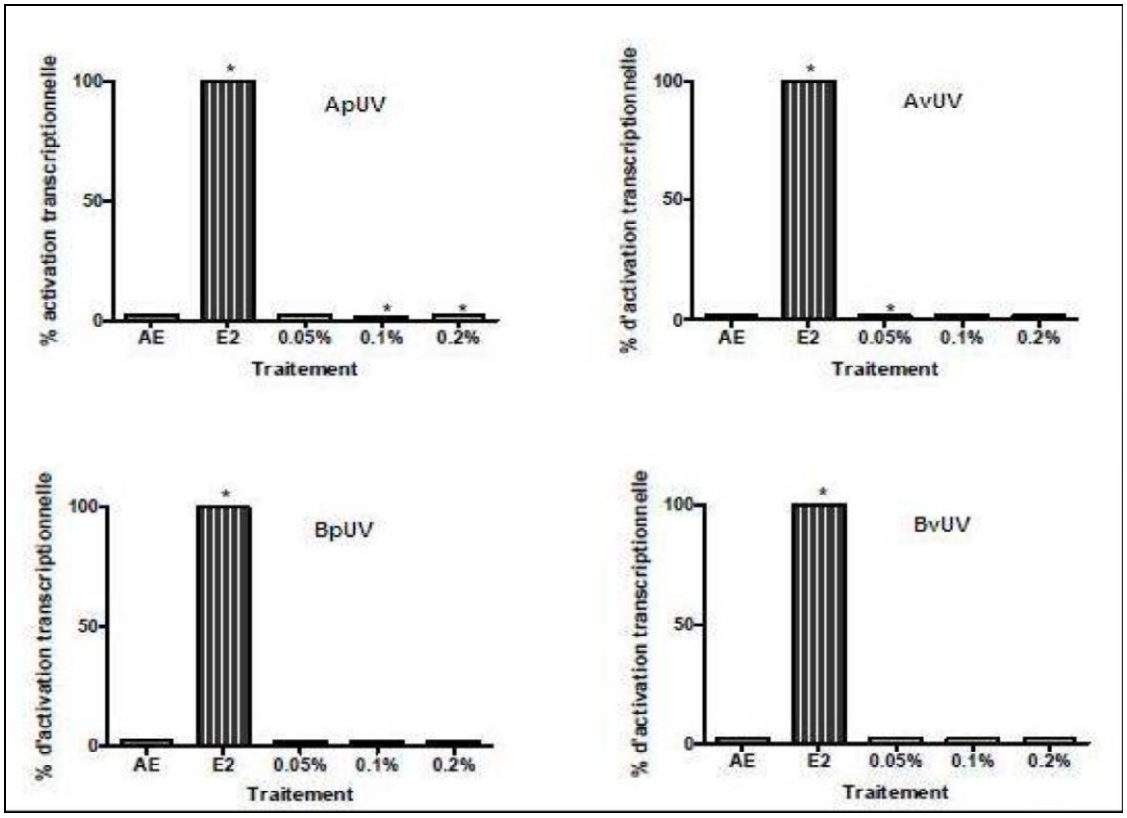


Figure 5-11: Activités transcriptionnelles des différents extraits de l'eau exposée à la lumières solaire pendant 10 jours liés au récepteur ERα. Les cellules HepG2 transfectées transitoirement par ERα et ERE-TK-Luc sont traitées aux concentrations indiquées pendant 24 h. L'activité (100%) correspond à l'activité obtenue avec le 17β-œstradiol (E2) à la concentration 0,1 nM (environ 4 200 000 cps). L'activité transcriptionnelle des extraits et du contrôle négatif (AE) à 0,25% dans le milieu, a été calculée par rapport au contrôle positif (E2). Le signe * indique des résultats statistiquement différents du témoin. Les valeurs représentées sont les moyennes de trois expériences indépendantes (3 puits par concentration)

Comme pour le cas précédent, le 17β-œstradiol (témoin positif) s'est avéré actif et sa réponse a été fixée à 100 %. Les extraits de l'eau embouteillée en PET et verre des bouteilles du groupe A après exposition solaire (ApUV et AvUV) ont montré des diminutions très faibles, mais statistiquement significatives, sur l'activité de la luciférase.

Pour les extraits de l'eau embouteillée en PET (ApUV) une variation est observée pour les concentrations à 0,1% (un facteur d'inhibition moyen de 1,7) et 0,2% (facteur d'inhibition de moyen 1,8) par rapport au témoin négatif, donc l'acétate d'éthyle à 0,2% (facteur d'inhibition de 2,5).

Dans le cas de l'eau embouteillée en verre (AvUV), seul l'extrait testé à la concentration de 0,05% (facteur d'inhibition de 1,8) a montré une différence significative par rapport au témoin négatif. Ces extraits ne sont donc pas œstrogéniques dans le modèle HepG2. Les effets inhibiteurs sur l'activité œstrogènique observés avec la marque A exposés à la lumière solaire pourraient être dus à un effet légèrement cytotoxique. Cependant, avant la réalisation des essais, la cytotoxicité des extraits a été testée à 0,05%, 0,1 % et 0,2% et la réponse s'est avéré négative. Par ailleurs, l'activité transcriptionnelle œstrogénique a été testée pour une seul bouteille de la marque A, donc les résultats risquent de ne pas être représentatifs. Aucune conclusion peut être extraite sur cet effet inhibiteur.

En ce qui concerne les extraits correspondants au même type d'eau de la marque B conditionnée en PET (BpUV) et en verre (BvUV), aucune différence de l'activité de la luciférase n'a été observée. Il n'y a donc pas d'effet œstrogénique après exposition solaire des bouteilles de la marque B.

Dans les conditions de l'essai, le potentiel perturbateur endocrinien œstrogènique sur ERα s'est avéré négatif pour les extraits d'eau des marques A et B, conditionnée en PET et en verre après exposition en plein soleil pendant 10 jours.

De manière générale, aucune activité œstrogénique n'a été observée avec les extraits d'un même type d'eau embouteillée en PET et en verre après exposition à la lumière solaire et exposition à la température pendant 10 jours.

Par rapport à la littérature, les résultats de cette étude ne sont pas en accord avec ceux des auteurs: Pinto et Reali (2009) ;Wagner et Oelhmann (2009) et Wagner et Oelhmann (2010) qui ont montré une activité œstrogénique dans l'eau embouteillée en PET dans différentes conditions.

Les différences observées dans les résultats des expositions à la température et à la lumière solaire obtenus peuvent être dues à plusieurs paramètres:

d) Les modèles cellulaires et les tests in vitro utilisés

Comme il a été évoqué et détaillé au début de ce chapitre, certains auteurs ont observé une activité œtrogénique dans des eaux minérales embouteillées en PET en utilisant différents types des tests tels que le « E-Screen » sur des cellules MCF-7 (Wagner et Oehlmann, 2010) ou le « *yeast estrogen assay* » sur des levures *S. cerevisae* liés au récepteur ERα (Pinto et Reali, 2009; Wagner et Oehlmann, 2009).

Le test « *E-Screen* » est un test de prolifération cellulaire qui permet de différencier des effets œstrogéniques sur des cellules cancéreuses mammaires humaines, MCF-7, riches en récepteurs aux œstrogènes et qui ont la propriété de proliférer en présence d'une molécule œstrogénique. Cette prolifération pouvant être due à un effet mitogène, des précautions sont à prendre comme l'utilisation en parallèle des cellules dépourvues en récepteurs. Le « *yeast estrogen assay* » est un test d'activation transcriptionnelle qui peut être réalisé sur des levures (*Saccharomyces cerevisae*) qui sont transitoirement ou stablement tranfectées avec un plasmide portant les séquences d'ADN d'un élément réponse à une hormone (HRE) couplé à un gène rapporteur comme ceux de la β-galactosidase ou de la luciférase. Les levures sont transformées par des vecteurs d'expression contenant les séquences du récepteur humain aux œstrogènes et les séquences du gène rapporteur. Cependant, l'utilisation de levures dans le test d'activité transcriptionnelle a l'inconvénient que ce modèle cellulaire a un manque d'enzymes de métabolisation et une faible représentativité d'un organisme eucaryote. De plus, la perméabilité membranaire de levures et les systèmes de transport des molécules affectent la mesure du potentiel œstrogènique des substances testées (Dumont, 2010).

Le potentiel perturbateur endocrinien a aussi été évalué au moyen des tests écotoxicologiques sur des escargots, *Potamopyrgus antipodarum* et sur des spores de champignons, *Alternaria alternate, Penicillium citrinum et Clasdosporium cladosporioides* (Criado *et al.*, 2005; Wagner et Oehlmann, 2009).

e) Les conditions de préparation des échantillons

Wagner et Oehlmann (2010) ont constaté que les techniques de préparation des échantillons avaient une influence directe sur l'extraction des composés œstrogéniques dans l'eau embouteillée. L'extraction en phase solide (SPE) est une technique très sélective et spécifique en fonction de la phase stationnaire sélectionnée. En effet, la famille de composés extraits et le recouvrement de ceux-ci est dépendant de l'affinité de la molécule retenues pour la phase stationnaire et de son affinité avec le solvant d'élution. Ces auteurs ont montré que l'utilisation des cartouches C18 est plus efficace pour extraire des composés œstrogéniques. Selon Wagner et Oelhmann (2010), l'efficacité d'extraction d'activité œstrogènique des cartouches Oasis HLB serait réduite de 3 fois comparées aux cartouches C18. Dans la présente étude, l'utilisation des cartouches Oasis HLB réduirait considérablement la récupération des composés à caractère œstrogénique ce qui pourrait expliquer les réponses négatives obtenues pour les extraits d'eau embouteillée.

f) Les conditions d'évaporation des extraits

Wagner et Oelhmann (2010) ont aussi rapporté que l'ajout de DMSO avant l'évaporation des extraits permet d'éviter la perte des composés volatils. Selon les auteurs, les composés avec activité œstrogènique de l'eau embouteillée seraient principalement des composés volatils. Dans cette étude, nous n'avons pas évaporé les extraits en acétate d'éthyle pour deux raisons:

- pour éviter une perte des composés ou une dégradation des substances présentes dans les extraits.
- pour éviter des pollutions des composés en provenance de l'extérieur, notamment des phtalates.

L'absence d'évaporation des extraits dans l'acétate d'éthyle permet de garder quelques composés volatils. Cependant, il est important de remarquer que l'utilisation du DMSO ou l'élimination de l'étape d'évaporation n'empêche en aucun cas la perte de composés très volatils générés par la dégradation du PET, comme par exemple, le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, le benzène, etc.

g) Le traitement des cellules

En ce qui concerne les protocoles d'essai en toxicologie pour évaluer l'activité œstrogénique, le traitement des cellules sur des microplaques qui ne sont pas fermées hermétiquement et l'incubation des cellules à 37°C peut accélérer la libération des certains composés pendant le traitement ce qui rend impossible dans ces conditions expérimentales l'évaluation du potentiel œstrogénique de ces composés.

h) La concentration des extraits

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les extraits dans l'acétate d'éthyle ont été dilués dans le milieu cellulaire à 0,2 % de façon à représenter la concentration initiale dans l'eau. Ce qui en termes de concentration des substances dans l'eau embouteillée pourrait s'assimiler à l'évaluation directe de l'eau sans concentration au préalable.

L'activité œstrogénique au moyen du « *yeast estrogen assay* » sur des lévures (*S.cerevisae)* a été évaluée par Wagner et Oelhmann (2009) sur l'eau embouteillée en PET et en verre sans concentration. Contrairement à nos résultats, une légère augmentation significative de l'activité œstrogènique a été observée dans l'eau embouteillée en PET par rapport à la même eau conditionnée en verre.

Cependant comme indiqué, les levures ont une faible représentativité d'un organisme eucaryote. A l'inverse, Pinto et Reali (2009) et Wagner et Oehlmann (2010) ont réalisé les essais d'œstrogénicité en concentrant l'eau d'un facteur 100 ou 200 et 75 au moyen de cartouches C18, respectivement. Cette concentration de l'échantillon pourrait se traduire par un effet œstrogènique mais ceci ne représente pas l'exposition du consommateur. De plus, le test « *E-screen* » manque de spécificité. En effet, la prolifération cellulaire peut être également une conséquence d'un effet mitogène, donc indépendant des récepteurs aux œstrogènes.

i) La qualité du PET

Une variabilité des résultats a été montrée par Sax (2010) au niveau de l'activité œstrogènique selon la marque de bouteilles testées. La gamme de concentration en équivalents d'estradiol (EEQ) a été mesurée entre 0,9 ng/L et 23,1 ng/L par Pinto et Reali (2009) pour l'ensemble de 9 marques italiennes de bouteilles en PET. Ce phénomène a aussi été montré pour différentes marques de bouteilles allemandes par Wagner et Oehlmann (2009) puisque les valeurs allaient de 2,64 à 75,2 ng/L d'EEQ.

Selon Pinto et Reali (2009), cette variabilité des résultats peut être attribuée à la qualité des produits chimiques utilisés et aux technologies de production. Ces méthodologies pour la synthèse du PET et de la mise en forme de la bouteille dépendent effectivement de l'industriel et de chaque pays. Par ailleurs, dans ces études seules deux marques de bouteilles ont été testées ce qui ne permet pas de faire des conclusions similaires.

De façon générale, comme nous l'avons évoqué précédemment, le point de faible de ces études est le manque d'analyse chimique des extraits qui permettrait de relier l'activité œstrogènique à un composé ou bien un mélange de substances et de connaître la source, l'origine des substances pouvant avoir un potentiel perturbateur endocrinien. Dans le présent travail, comme il a été présenté dans le chapitre 4, nous avons identifié et quantifié un seul composé, le 2,4-di-*tert*-butylphénol, présent dans nos extraits d'eau embouteillée en verre et en PET. Ceci a permis de constater que les bouteilles en PET testées ne sont pas une source de substances ayant un potentiel « perturbateur endocrinien » en mélange dans les conditions d'essai.

5.7 TEST DU POTENTIEL PERTURBATEUR ENDOCRINIEN (ANTI)-ANDROGENIQUE

Pour analyser cette toxicité, un test d'activation transcriptionnelle sur la lignée cellulaire MDA-MB453-kb2, dérivant d'une effusion pleurale issue d'une tumeur mammaire humaine riche en récepteur aux androgènes (AR) a été utilisée. Il s'agit d'un test à court terme qui permet une évaluation du potentiel perturbateur endocrinien de type androgénique d'une substance. La lignée cellulaire MDA-MB453-kb2 a été stablement transfectée par un plasmide contenant le gène de la luciférase (plasmide pMAMneo-Luc) sous le contrôle de l'élément de réponse aux androgènes (AR) (Wilson *et al.*, 2002). Il est ainsi possible de tester une activité anti-androgénique suite à une activation transcriptionnelle du récepteur AR basée sur l'induction de la transcription d'un gène rapporteur (luciférase).

5.7.1 Matériel et méthodes

5.7.1.1 Réactifs et produits

Les différents réactifs et produits chimiques utilisés pour la réalisation de l'essai sont répertoriés dans le tableau 5-10.

Tableau 5-10: Réactifs et produits chimiques utilisés pour la réalisation des tests du potentiel perturbateur endocrinien (anti)-androgénique

Produits (abréviation)	Fournisseur
Milieu de culture Leibovitz 15 (L15)	Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
Sérum de veau fœtal (SVF)	Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
L-glutamine 200 mM	Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
Tampon phosphate sodium (PBS)	Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
Trypside EDTA 0,05%	Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
Dihydrotestostérone, N°CAS 521-18-6, (DHT)	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Nilutamide, N°CAS 63612-50-0, (Nil)	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Réactif de lyse, (CCLR 5X)	Promega (Charbonnières-les-Bains, France)
Luminol	Promega (Charbonnières-les-Bains, France)
Réactifs du tampon phosphate	Merck (Lyon, France)
Réactifs de Bradford	BioRad (Munich, Allemagne)

5.7.1.2 Modèle cellulaire

L'étude du potentiel perturbateur endocrinien (anti)-androgénique a été réalisée sur des cellules MDA-MB453-kb2 (cf. fig. 5.12) stablement transfectées par le plasmide pMAMneo-Luc fournies par l'American Type Culture Collection (LGC Promochem, Molsheim, France). La croissance des cellules MDA-MB453-kb2 est dépendante de la présence des androgènes dans le milieu de culture. Ces cellules se caractérisent par leur adhérence et elles sont maintenues en couche monocellulaire.

Le plasmide pMAMneo-Luc possède la séquence génétique de réponse au récepteur des androgènes sous le contrôle du gène promoteur MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus). De plus, le pMAMneo-Luc contient le gène rapporteur qui code la synthèse de la luciférase.

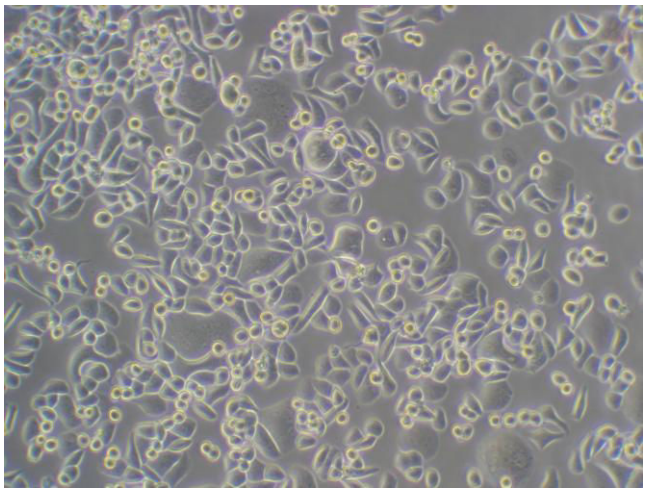


Figure 5-12: Cellules MDA-MB453-kb2 utilisées pour la réalisation des essais d'activité transcriptionnelle du potentiel (anti)-androgénique

Ces cellules sont cultivées sur une surface de 75 cm^2 dans un flacon de culture (Dutscher, Brumath, France) dans le milieu Leibovitz-15 enrichi avec du sérum de veau fœtal (SVF) à 10% (v/v). L'incubation est réalisée à 37°C sous 5% CO_2. Le milieu cellulaire est renouvelé toutes les 48h. Les traitements sont effectués sur 10 passages maximum.

5.7.1.3 Les substances témoins:

Des témoins négatifs et positifs ont été utilisés afin de valider l'essai.

- ***Le témoin négatif:*** le témoin négatif est l'acétate d'éthyle à une concentration de 0,2 %. Cette concentration est la même dans tous les puits de la microplaque indépendant de la concentration de l'échantillon d'essai.
- ***Les témoins positifs:*** pour les essais d'androgénicité, le témoin positif est la dihydrotéstostérone (DHT) à 0,4 nM préparée dans l'acétate d'éthyle. Dans les essais anti-androgéniques, une solution de nilutamide (Nil), référence positive, à 1 µM préparée dans l'acétate d'éthyle est utilisée comme référence positive.

5.7.2 Conditions Opératoires

5.7.2.1 Ensemencement des cellules

Les cellules MDA-MB453-kb2 stablement transfectées sont ensemencées dans de plaques de 24 puis à raison de 50 000 cellules par puits dans un milieu L15 sans rouge de phénol. Le milieu est supplémenté en 5 % de SVF destéroïdé. Les cellules sont incubées pendant 24 h dans une étuve à 37°C sans CO_2.

5.7.2.2 Traitement des cellules MDA-MB453-kb2

Les puits des microplaques sont vidés et rincés avec 500 µl de tampon phosphate (PBS). Puis 1 mL du milieu de traitement est déposé dans chaque puits. En fonction du type de l'activité à tester (androgénique ou anti-androgénique) la composition du milieu de traitement est différente.

- ***Pour les essais de l'activité androgénique :*** Le traitement des cellules est réalisé avec les échantillons d'essai à différentes concentrations : 0,05, 0,1 et 0,2 %.
- ***Pour les essais de l'activité anti-androgénique :*** Le milieu de traitement est réalisé avec l'échantillon d'essai à différentes concentrations (0,05, 0,1 et 0,2 %) mélangés à la dihydrotestostérone (DHT) à 0,4 nM.

De plus, un témoin négatif (acétate d'éthyle à 0,2%) et un témoin positif (nilutamide 1µM) tout seul et mélangé avec la DHT sont ajoutés à chaque série d'essais afin de vérifier la validité des essais et l'expression des résultats.

Les cellules sont en contact avec le milieu de traitement pendant 24 h. Les puits sont vidés et rincés avec 500 µL de PBS. Le lysage des cellules est réalisé en ajoutant 200 µL du réactif de lyse (CCLR 5X) dans chaque puits. La microplaque est agitée pendant 30 min. Puis le lysat cellulaire de chaque puits est transféré dans un microtube. Les lysats sont mélangés au vortex entre 10 à 15 s avant d'être centrifugés à 3000 g à une température de 4°C pendant 10 min.

5.7.2.3 Dosages

Le dosage de la luciférase et les protéines sont basés sur les mêmes principes décrits dans la section 5.5.2.4.

- ***Le dosage de la luciférase*** consiste à mesurer l'activité enzymatique de la luciférase en ajoutant, dans le milieu, son substrat, la luciférine. La mesure de cette activité illustre alors la capacité d'un ligand du récepteur aux androgènes à initier la transcription du gène rapporteur. La lecture se fait sur un Top Count NXT (Packard Bioscience Company, Meriden) en coups par seconde (cps).
- ***Le dosage des protéines*** est basé sur les mêmes principes déjà décrits dans la section 5.5.2.4.

5.7.3 Résultats expérimentaux

5.7.3.1 Résultats des extraits des eaux embouteillées en PET et verre exposées à 60°C pendant 10 jours

L'ensemble des résultats de l'activité transcriptionnelle du potentiel (anti)-androgénique des extraits des eaux embouteillées en verre et PET des marques A et B après exposition à la température sont représentés sur la figure 5-13.

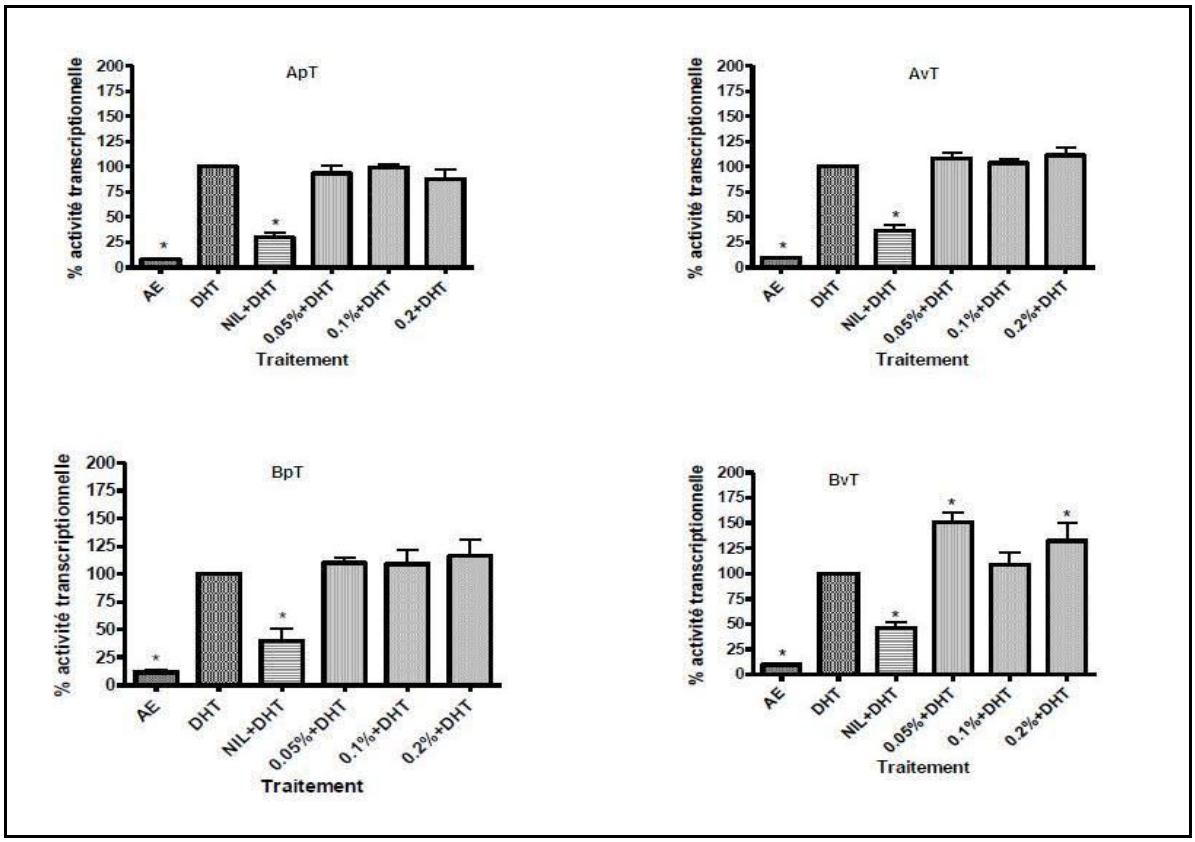


Figure 5-13: Activés transcriptionnelles des différents extraits de l'eau embouteillée exposée à 60°C pendant 10 jours liées au récepteur aux androgènes. Les cellules sont traitées aux concentrations indiquées pendant 24h. L'activité maximale (100%) correspond à l'activité obtenue avec la DHT à la concentration de 0,4 nM (environ 24 000 cps). Les signes * indiquent des résultats statistiquement différents du témoin DHT. Les valeurs représentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes (3 puits par concentration)

La nilutamide s'est avérée active sur l'activité androgénique de la DHT. En ce qui concerne les extraits d'eau plate de la marque A conditionnée en verre (AvT) ou en PET (ApT) aucune différence statistiquement significative de l'activité anti-androgénique n'a été observée. Le même type de résultat négatif a été obtenu pour l'extrait d'eau gazeuse conditionnée en PET de la marque B (BpT).

Cependant, la même eau embouteillée en verre (BvT) a montré une légère augmentation de l'activité transcriptionnelle statistiquement significative dans l'essai anti-androgénique pour les extraits testés à 0,05 % (facteur d'induction de 151 %) et 0,2% (facteur d'induction moyen de 130 %). Le potentiel androgénique a donc été étudié (cf. figure 5-14). L'extrait n'a pas montré un caractère androgénique dans les conditions expérimentales sur les cellules MDA-MB453-kb2.

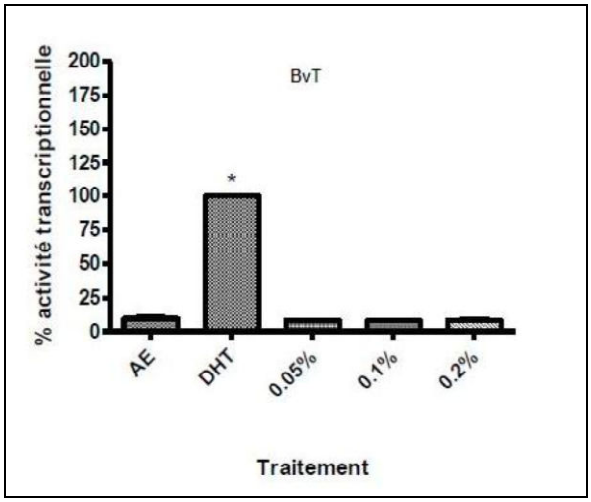


Figure 5-14: Activité transcriptionnelle liées au récepteur des androgènes de l'extrait d'eau gazeuse embouteillée en PET de la marque B. Les cellules sont traitées aux concentrations indiquées pendant 24 h. L'activité maximale (100%) correspond à l'activité obtenue avec la DHT à la concentration de 0,4 nM (environ 24 000 cps.). Les signes * indiquent des résultats statistiquement différents du témoin DHT

5.7.3.2 Résultats des extraits des eaux embouteillées en PET et verre de la marque A et B exposées à la lumière solaire directe pendant 10 jours

L'ensemble des résultats obtenus pour les extraits des eaux embouteillées des groupes A et B après exposition solaire est représenté sur la figure 5-15.

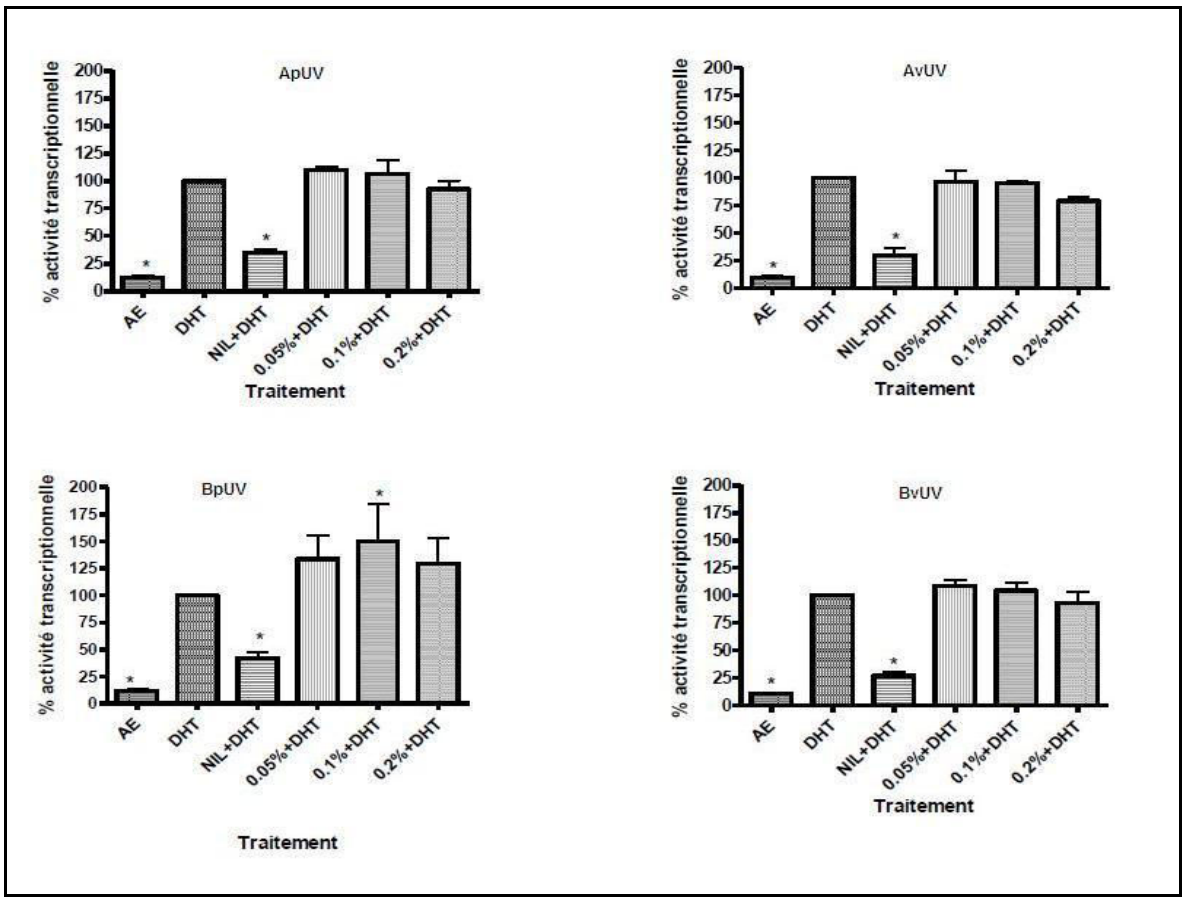


Figure 5-15: Activés transcriptionnelles des différents extraits d'eau exposée à la lumière solaire pendant 10 jours liées au récepteur aux androgènes. Les cellules MDA-MB453-kb2 sont traitées aux concentrations indiquées pendant 24h. L'activité maximale (100%) correspond à l'activité obtenue avec la DHT à la concentration de 0,4 nM (environ 24 000 cps). Les signes * indiquent des résultats statistiquement différents du témoin DHT. Les valeurs représentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes (3 puits par concentration)

Comme dans le cas précédent, la nilutamide s'est avérée active sur l'activité androgénique de la DHT. Pour les extraits de la marque A des eaux plates embouteillées en verre et PET, aucune différence statistiquement significative par rapport au DHT (témoin positif) n'a été observée et ceci quelles que soient les concentrations testées. Pour les extraits de la marque À (PET et verre) aucune activité anti-androgénique n'a été observée.

Par rapport à la marque B, l'extrait de l'eau gazeuse embouteillée en verre (BvUV) n'a pas montré de potentiel perturbateur endocrinien anti-androgénique. Cependant, l'extrait testé à 0.1% de la même eau embouteillé en PET (BpUV) induit une activité plutôt androgénique par rapport au témoin DHT. Ce possible effet androgénique a également été vérifié. Cependant, aucun effet statistiquement significatif n'a été observé (cf. figure 5-16). Les effets observés pourraient être dus à un effet de potentialisation de l'extrait sur la DHT.

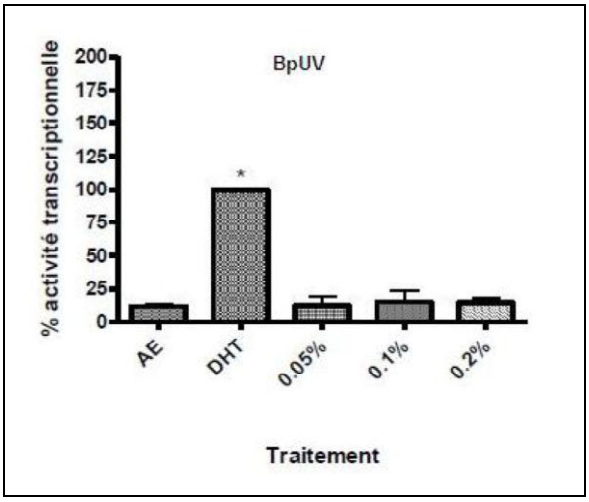


Figure 5-16: Activité transcriptionnelle liées au récepteur des androgènes de l'extrait d'eau gazeuse embouteillée en PET de la marque B. Les cellules sont traitées aux concentrations indiquées pendant 24 h. L'activité maximale (100%) correspond à l'activité obtenue avec la DHT à la concentration de 0,4 nM (environ 24 000 cps.) Les signes * indiquent des résultats statistiquement différents du témoin DHT

Par rapport à la littérature, c'est la première fois que des effets potentiellement (anti)androgéniques ont été recherchés sur les eaux embouteillées.

En conclusion, dans les conditions expérimentales aucun potentiel anti-androgénique et androgénique sur le récepteur AR a été observé après exposition de l'eau embouteillée à une température de 60°C pendant 10 jours et à la lumière solaire directe, quel que soit le type d'eau (plate ou gazeuse) et le matériau d'emballage (PET/verre).

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de cette thèse a été d'aborder la question de la migration des constituants des bouteilles PET vers l'eau conditionnée avec une approche globale, afin de répondre aux interrogations suscitées par un certain nombre de publications.

Pour cela, les méthodes analytiques les plus polyvalentes ont été utilisées, afin de détecter le plus grand nombre de substances. Parallèlement à ces données chimiques des informations sur les aspects toxicologiques ont été recherchées, au moyen d'une batterie complète de tests. La caractérisation de l'état structural, l'étude des mouvements macromoléculaires et la morphologie semi-cristalline des chaînes macromoléculaires qui constituent les bouteilles en PET devaient permettre d'expliquer les migrations observées.

Après trois années d'investigations, les analyses chimiques ont permis dans un premier temps d'identifier qualitativement un certain nombre de substances, dont certaines figuraient également dans la liste récemment publiée par l'*Institut allemand pour l'évaluation des risques sanitaires (BfR).* Cependant, les analyses quantitatives n'ont confirmé que la présence de trois composés organiques (formaldéhyde, acétaldéhyde et 2,4-di-*tert*-butylphénol) et un élément inorganique (antimoine) dans l'eau embouteillée en PET. Ces résultats ont été obtenus en exposant les bouteilles dans des conditions relativement drastiques (10 jours à 60°C ou 10 jours en plein soleil).

L'origine du formaldéhyde, l'acétaldéhyde et l'antimoine a été clairement établie auparavant dans la bibliographie. Les deux premiers composés sont des produits de dégradation thermique ou/et oxydative. L'antimoine est un résidu du catalyseur pour la synthèse du PET. La présence du 2,4-di-*tert*-butylphénol dans les eaux embouteillées en PET et en verre fait suspecter que cette substance est un produit de dégradation thermique des antioxydants phénoliques utilisés pour la fabrication des bouchons et joints en polyéthylène.

Pour les deux marques d'eau embouteillée en PET et en verre, les concentrations des autres composés détectées après vieillissement accéléré se sont révélées inférieures à la LQ de la méthode d'analyse. Aucune présence de phtalates, d'antioxydants et de stabilisants UV a été quantifiée dans l'eau des bouteilles, conformément aux formulations déclarées pour la synthèse du PET destiné au conditionnement de l'eau.

Les essais de migration dans différentes conditions d'exposition ont montré les résultats suivants:

- La température influence fortement la migration de l'antimoine et l'acétaldéhyde, et dans une moindre mesure la migration de 2,4-di-*tert*-butylphénol et du formaldéhyde.
- La lumière solaire n'influence que la migration et/ou la génération du formaldéhyde.
- La typologie de l'eau joue un rôle sur la migration de certaines molécules, parfois en synergie avec les conditions d'exposition. Ainsi, le gaz carbonique favorise la migration de l'antimoine, du formaldéhyde et de l'acétaldéhyde, et dans une moindre mesure celle du 2,4-di-*tert*-butylphénol. La minéralisation de l'eau peut freiner dans certaines conditions (température d'exposition inférieure à 50°C) la migration du formaldéhyde et de l'acétaldéhyde. L'usage de l'eau ultrapure en remplacement de l'eau gazeuse sous-estime les niveaux de migration. Ce simulant préconisé par la réglementation ne reproduit pas fidèlement les phénomènes observés pour les eaux carbonatées. Cependant, dans tous les cas de figures, les LMS n'ont jamais été dépassées.

L'impact de l'exposition solaire sur la migration trouve des explications dans l'analyse structurale des bouteilles en PET. Après une irradiation naturelle de 238 MJ/m^2, aucune oxydation des chaînes polymériques n'est détectée en surface des bouteilles. L'impact prépondérant des températures élevées est bien confirmé par l'étude des mouvements macromoléculaires par spectrométrie de relaxation mécanique. Dès 60°C, une perte de l'orientation de la phase amorphe sur la partie semi-cristalline de la bouteille est mise en évidence. Celle-ci entraîne une augmentation de la mobilité des chaînes polymériques et donc favorise les migrations potentielles. A température ambiante, la caractérisation du PET a permis d'établir que le polymère présente un taux de cristallinité de 30% et que la partie amorphe des bouteilles est fortement orientée, ce qui contribue à l'imperméabilité de l'emballage et à une réduction de la diffusion des différents migrats.

L'étude toxicologique *in vitro* a été réalisée sur les migrats les plus concentrés. Dans les conditions d'essai, aucune cytotoxicité, aucune génotoxicité et aucune perturbation endocrinienne de type œstrogènique et (anti)androgénique n'a été mise en évidence.

Les contraintes techniques des tests toxicologiques, lorsque l'on ne travaille pas sur des extraits aqueux, font que les résultats peuvent être partiellement biaisés. En effet, ces essais ont été conduits sur des extraits concentrés sur des cartouches SPE ne garantissant pas la présence de l'antimoine dans l'éluat. Par ailleurs, les molécules volatiles comme le formaldéhyde et l'acétaldéhyde sont éliminées lors des étapes d'extraction et au cours des essais toxicologiques en raison des conditions opératoires (incubation des cellules à 37°C et sous flux de CO_2). Au final, seul le 2,4-di-*tert*-butylphénol et des molécules potentiellement co-extraites, mais non identifiées, ont pu être évalués au cours des essais toxicologiques. Néanmoins, les effets « mélange » ont pu être évalués par ces essais toxicologiques.
Pour palier ces inconvénients, il faudrait imaginer et mettre en place des méthodes permettant de conduire des essais toxicologiques sur l'ensemble des molécules présentes dans les migrats et n'entraînant pas de modifications de leur composition au cours des essais.

Sur un plan analytique, certaines améliorations et investigations complémentaires pourraient être également proposées. La méthode multi-résidus n'a pas permis de quantifier certaines molécules comme l'érucamide en raison de conditions chromatographiques non adaptées. Cette molécule ou des produits apparentés (oléamide) ayant été identifiés dans d'autres publications (Buiarelli *et al.*, 1993; Monteiro *et al.*, 1998; Strube *et al.*, 2009) et étant potentiellement utilisés pour le vissage des bouchons, sa présence devrait l'objet de confirmation. Certains auteurs (Wagner et Oehlmann, 2009; 2010) ont affirmé qu'en fonction des protocoles d'extraction on ne récupérait pas les mêmes composés et que par conséquent, les réponses des tests toxicologiques pouvaient grandement varier. Il conviendrait donc de confirmer analytiquement que la mise en place de protocoles différents d'extraction conduit à l'obtention de migrats de diverses compositions.

Au cours de notre étude, seules les molécules se prêtant à une analyse par GC ont été prises en compte. Il conviendrait en complément de cette approche, de conduire des analyses par LC avec un détecteur permettent l'identification structurale des molécules (Orbitrap®, Qtrap, QTOF, TOF, etc.).

Malgré les biais soulignés de cette étude, les résultats obtenus ne soulèvent pas des préoccupations sanitaires quand à la consommation d'eau embouteillée en PET.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFNOR, 2008. XP P41-250-3. Effet des matériaux sur la qualité des eaux destinées à la consomation humaine. Matériaux organiques. Partie 3: Obtention des eaux de migration pour la mesure de la cytotoxicité.

AFSSA, 2006. Evaluation sanitaire des matériaux en poly(éthylène téréphtalate) recyclés utilisés en tant que matériaux au contact des denrées alimentaires et de l'eau de boisson. http://www.contactalimentaire.com/fileadmin/ImageFichier_Archive/contact_alimentaire/Fichiers_Documents/Avis_AFSSA-CSHPF/avis_du_27-11-2006rap.pdf [consulté le 15 juillet 2011].

Ames, B.N., McCann, J. et Yamasaki, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation research 31(6), 347-364.

Ashby, R., 1988. Migration from polyethylene terephthalate under all conditions of use. Food Additives and Contaminants 5(Suppl. 1), 485-492.

Atkinson, J.R., Biddlestone, F. et Hay, J.N., 2000. An investigation of glass formation and physical ageing in poly(ethylene terephthalate) by FT-IR spectroscopy. Polymer 41(18), 6965-6968.

Aubert, A., 1998. Thèse. Etude et modélisation de la déformation plastique du PET au voisinage de la transition vitreuse. Optimisation d'emballages soumis à une pression interne. Institut Nationale Polythecnique de Lorraine, Nancy (France).

Awaja, F. et Pavel, D., 2005. Recycling of PET. European Polymer Journal 41(7), 1453-1477.

Bach, C., Dauchy, X., David, L. et Étienne, S., 2011. Étude physico-chimique des bouteilles d'eau conditionnées en poly(éthylène téréphtalate). Matériaux & Techniques 99(4), 391-408.

Beck, I.C., Bruhn, R. et Gandrass, J., 2006. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. Chemosphere 63(11), 1870-1878.

Begley, T.H. et Hollifield, H.C., 1989. Liquid chromatography determination of residual reactants and reaction by-products in polyethylene terephtalate. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 72(3), 468-470.

Besnoin, J.M. et Choi, K.Y., 1989. Identification and characterization of reaction byproducts in the polymerisation of polyethylene terephthalate. Journal of Macromolecular Science - Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics C29(1), 55-81.

BfR, 2011. Opinion No. 007/2011. BfR assesses analyse of substances with hormone-like activity in natural mineral waters. http://www.bfr.bund.de/en/publication/bfr_opinions_2011-127797.html [consulté le 13 juillet 2011].

Biscardi, D., Monarca, S., De Fusco, R., Senatore, F., Poli, P., Buschini, A., Rossi, C. et Zani, C., 2003. Evaluation of the migration of mutagens/carcinogens from PET bottles into mineral water by Tradescantia/micronuclei test, Comet assay on leukocytes and GC/MS. Science of the Total Environment 302(1-3), 101-108.

Bouchonnet, S., 2009. La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. Editions Tec & Doc, Lavosier. Paris (France).

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.

Brocca, D., Arvin, E. et Mosbœk, H., 2002. identification of organic compoounds migrating from polyethylene pipelines into drinking water. Water Research 36, 3675-3680.

Buiarelli, F., Cartoni, G. et Cocciolo, F., 1993. HPLC and GC-MS detection of compounds released to mineral waters stored in plstic bottles of PET and PVC. Annali di Chimica 83, 93-104.

Burgot, G. et Burgot, J.L., 2002. Méthodes Instrumentales d'Analyse Chimique et Applications. Méthodes Chromatographiques, Electrophorèses et Méthodes Spectrales. Editions Tec & Doc. Paris (France). 306 p.

Butterworth, B.E., Bermudez, E., Smith-Oliver, T., Earle, L., Cattley, R., Martin, J., Popp, J.A., Strom, S., Jirtle, R. et Michalopoulos, G., 1984. Lack of genotoxic activity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in rat and human hepatocytes. Carcinogenesis 5(10), 1329-1335.

Cabaton, N., Dumont, C., I., S., E., P., Zalko, D., Cherkaoui-Malki, M. et Chagnon, M.C., 2009. Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. Toxicology 255, 15-24.

Campanelli, J.R., Kamal, M.R. et Cooper, D.G., 1993. Kinetic study of the hydrolytic degradation of polyethylene terephthalate at high temperatures. Journal of Applied Polymer Science 48(3), 443-451.

Cao, X.L., 2010. Phthalate Esters in Foods: Sources, Ocurrence, and Analytical Methods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 9, 21-43.

Carta, D., Cao, G. et D'Angeli, C., 2003. Chemical recycling of poly(ethylene terephthalate) (PET) by hydrolysis and glycolysis. Environmental Science & Pollution Research 10(6), 390 - 394.

Casajuana, N. et Lacorte, S., 2003. Presence and release of phthalic esters and other endocrine disrupting compounds in drinking water. Chromatographia 57(9-10), 649-655.

Castle, L., Mayo, A., Crews, C. et Gilbert, J., 1989. Migration of poly(ethylene terephthalate)(PET) oligomers from PET plastics into foods during microwave and conventional cooking and into bottled beverages. Journal of Food Protection 52(5), 337-342.

Ceretti, E., Zani, C., Zerbini, I., Guzzella, L., Scaglia, M., Berna, V., Donato, F., Monarca, S. et Feretti, D., 2010. Comparative assessment of genotoxicity of mineral water packed in polyethylene terephthalate (PET) and glass bottles. Water Research 44(5), 1462-1470.

Chen, J.W. et Chen, L.W., 1999. The kinetics of diethylene glycol formation from bis-hydroxyethyl terephthalate with antimony catalyst in the preparation of PET. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry 37(12), 1797-1803.

Cheng, X., Shi, H., Adams, C.D. et Ma, Y., 2010. Assessment of metal contaminations leaching out from recycling plastic bottles upon treatments. Environmental Science and Pollution Research 17(7), 1323-1330.

Chevalier, L., Marco, Y. et Regnier, G., 2001. Modification des propiétés durant le soufflage des bouteilles plastiques en PET. Mécaniques & Industries 2, 229-248.

Ciolacu, C.F.L., Roy Choudhury, N. et Dutta, N.K., 2006. Colour formation in poly(ethylene terephthalate) during melt processing. Polymer Degradation and Stability 91(4), 875-885.

Cotter, R.J., 1992. Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. Analytical Chemistry 64(21), 1027A-1039A.

Criado, M.V., Fernández Pinto, V.E., Badessari, A. et Cabral, D., 2005. Conditions that regulate the growth of moulds inoculated into bottled mineral water. International Journal of Food Microbiology 99(3), 343-349.

Cros, S., 2007. Propiétés barrières des polymères utilisés en emballage. Techniques de l'ingénieur AM3160, 13 p.

Dabrowska, A., Borcz, A. et Nawrocki, J., 2003. Aldehyde contamination of mineral water stored in PET bottles. Food Additives and Contaminants 20(12), 1170-1177.

Daubeny, R.P. et Bunn, C.W., 1954. The crystal structure of polyethylene terephthalate. Proceedings of the Royal Society A, 531-542.

David, F., Sandra, P., Tienpont, B., Vauwalleghem, F. et Ikonomou, M., 2003. Analytical Methods Review. The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3, 9-56.

David, L. et Etienne, S., 1992. Molecular mobility in para-substituted polyaryls. 1. Sub-Tg relaxation phenomena in poly(aryl-ether-ether-ketone). Macromolecules 25(17), 4302-4308.

De Fusco, R., Monarca, S., Biscardi, D., Pasquini, R. et Fatigoni, C., 1990. Leaching of mutagens into mineral water from polyethyleneterephthalate bottles. Science of the Total Environment 90, 241-248.

Della Seta, D., Minder, I., Belloni, V., M., A.A., Dessi-Fulgheri, F. et Farabollini, F., 2006. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. Hormonal Behaviour 50, 301-307.

Desmots, S., Brulez, C. et Lemazurier, E., 2005. Perturbateurs de la fonction endocrinienne et santé: un point non exhaustif sur les connaissances. Environnement, Risques & Santé 4(3), 195-204.

DGS/SD7A, 2003. Circulaire DGS/SD 7A, n°2003/445 du 17 septembre 2003 concernant les modalités d'application de l'arrêté relatif aux méthodes d'analyse d'échantillons d'eau et à leurs caractéristiques de performance.

Duchesne, C., Kong, X., Brisson, J., Pérozet, M. et Prud'homme, R.E., 2002. Molecular orientation and relaxation of poly(ethylene terephthalate) by polarization modulation infrared spectroscopy. Macromolecules 35, 8768-8773.

Dumont, C., 2010. Thèse. Génotoxicité et potentiel perturbateur endocrinien de contaminants de l'aliment, modèle cellulaire HepG2 - mécanismes moléculaires. Université de Bourgogne, Dijon (France).

Dybing, E., 2002. Development and implementation of the IPCS conceptual framework for evaluating mode of action of chemical carcinogens. Toxicology 181-182, 121-125.

Dzięciol, M. et Trzeszczyński, J., 1998. Studies of temperature influence on volatile thermal degradation products of poly(ethylene terephthalate). Journal of Applied Polymer Science 69(12), 2377-2381.

Edge, M., Allen, N.S., Wiles, R., McDonald, W. et Mortlock, S.V., 1995. Identification of luminescent species contributing to the yellowing of poly(ethyleneterephthalate) on degradation. Polymer 36(2), 227-234.

Edge, M., Wiles, R., Allen, N.S., McDonald, W.A. et Mortlock, S.V., 1996. Characterisation of the species responsible for yellowing in melt degraded aromatic polyesters - I: Yellowing of poly(ethylene terephthalate). Polymer Degradation and Stability 53(2), 141-151.

El-Toufaili, F.A., 2006. Thèse. Catalytic and mechanistic studies of polyethylene terephthalate synthesis, Université de Berlin, Berlin (Allemagne).

Elias, H.G., 1993. An introduction to plastics. Wiley-VCH. New York (USA).

Ergene, S., Celik, A., Cavas, T., Köleli, T. et Aymak, C., 2008. The evaluation of toxicity and mutagenicity of various drinking waters in the human blood lymphocytes (HULYs) in vitro. Food and Chemical Toxicology 46(7), 2472-2475.

Etienne, S. et David, L., 2002. Introduction à la physique des polymères, Dunod, Paris (France).

Etienne, S., Hazed, N., Duval, E., Marmet, A., Wypych, A. et David, L., 2007. Physical aging and molecular mobility of amorphous polymers. Journal of Non-Cristalline Solids 353(41-43), 3871-3878.

Etienne, S., Perez, J., Vassoille, R. et Bourgin, P., 1991. Interaction faisceau laser de forte puissance - matériau polymère. J. Phys. III France 1(9), 1587-1608.

EU, 2011. Commission regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come in contact with food, Official Journal of the European Commission.

Evandri, M.G., Tucci, P. et Bolle, P., 2000. Toxicological evaluation of commercial mineral water bottled in polyethylene terephthalate: A cytogenetic approach with Allium cepa. Food Additives and Contaminants 17(12), 1037-1045.

Ewender, J., Franz, R., Mauer, A. et Welle, F., 2003. Determination of the migration of acetaldehyde from pet bottles into non-carbonated and carbonated mineral water. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 99(6), 215-221.

Facemire, C., Gross, T. et Guillette, L., 1995. Reproductive impaiment in the Florida panther: nature or nurture? Environmental Health Perspectives Suplements 103(4), 79-86.

Fankhauser-Noti, A. et Grob, K., 2007. Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: Investigation of the sources, tips and tricks. Analytica Chimica Acta 582(2), 353-360.

Fankhauser-Noti, A. et Grob, K., 2006. Migration of plasticizers from PVC gaskets of lids for glass jars into oily foods: Amount of gasket material in food contact, proportion of plasticizer migrating into food and compliance testing by simulation. Trends in Food Science & Technology 17(3), 105-112.

Farré, M., Martínez, E. et Barceló, D., 2008. Techniques de détermination de composés organiques dans l'environnement. Techniques de l'ingénieur P3 820, 20 p.

Fauris, C., Danglot, C. et Vilagines, R., 1985. Rapidity of RNA synthesis in human cells: A highly sensitive parameter for water cytotoxicity evaluation. Water Research 19(6), 677-684.

Fauris, C., Ranglot, C. et Vilagines, R., 1981. Mesure de la cytotoxicité des eaux par inhibition de la synthèse d'ARN cellulaire: mise au point d'une micromèthode de mesure de la vitesse de synthèse d'ARN et domaines d'application. Les colloques de l'INSERM. Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatiques. INSERM 106, 455-463.

Fayolle, B. et Verdu, J., 2005. Vieillissement physique des matériaux polymères. Techniques de l'ingénieur AM3150(19 p).

Fechine, G.J.M., Souto-Maior, R.M. et Rabello, M.S., 2002. Structural changes during photodegradation of poly(ethylene terephthalate). Journal of Materials Science 37(23), 4979-4984.

Feigenbaum, A., Dole, P., Aucejo, S., Dainelli, D., Garcia, C.D.L.C., Hankemeier, T., N'gono, Y., Papaspyrides, C.D., Paseiro, P., Pastorelli, S., Pavlidou, S., Pennarun, P.Y., Saillard, P., Vidal, L., Vitrac, O. et Voulzatis, Y., 2005. Functional barriers: Properties and evaluation. Food Additives and Contaminants 22(10), 956 - 967.

Feigenbaum, A., Riquet, A.-M., Ducruet, V. et Scholler, D., 1993. Safety and quality of foodstuffs in contact with plastic materials: A structural approach. Journal of Chemical Education 70(11), 883-null.

Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 455(1-2), 81-95.

Foltete, A.S., 2010. Thèse. Effets génotoxiques et systèmes de détoxification chez *Vicia Faba* (Fabaceae) dans le cadre de l'évaluation de sols pollués, Université Paul Verlaine, Metz (France).

Fontanals, N., Marcé, R.M. et Borrull, F., 2005. New hydrophilic materials for solid-phase extraction. Trends in Analytical Chemistry 24(5), 394-406.

Franz, R., Huber, M., Piringer, O., Damant, A.P., Jickels, S.M. et Castle, L., 1996. Study of functional barrier properties of multilayer recycled materials poly(ethylene terephthalate) bottles for soft drinks. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44(3), 892-897.

Franz, R., Mauer, A. et Welle, F., 2004. European survey on post-consumer poly(ethylene terephthalate) materials to determine contamination levels and maximum consumer exposure from food packages made from recycled PET. Food Additives & Contaminants 21(3), 265-286.

Franz, R. et Welle, F., 2008. Investigation of non-intentionally added substances (NIAS) in PET bottles and closures, Poster presentation at the 4th International Symposium on Food Packaging, 19-21 November, Prague (Czech Republic).

Fries, E. et Pütman, W., 2002. Analysis of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) in water by means of solid phase extraction combined with GC/MS. Water Research 36, 2319-2327.

Fritz, J.S., 1999. Analytical Solid-Phase Extraction, Wiley-VCH, New York, USA.

FSA, 2007. Report FD07/01: An investigation into the reaction and breakdown products from starting substances used to produce food contact plastics, Food Standards Agency, London (United Kindom).

Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.C. et Séralini, G.E., 2009. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. Toxicology 262, 184-191.

Grob, K., Biedermann, M., Scherbaum, G., Roth, M. et Rieger, K., 2006. Food contamintion with organic materials in perspective: Packaging materials as the largest and least controlled source? A view focusing on the European situation. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 46(7), 529-536.

Gross, M.L. et Caprioli, R., 2006. Encyclopedia of Mass Spectrometry, vol. 6, Ionization methods, Tec & Doc Lavoisier.

Gru, Y., 2010. Thèse. Couplage avancé de type HPLC avec préconcentration en ligne et spectrométrie de masse (SPE-LC-MS/MS): Identification et quantification de micropolluants organiques dans les eaux. Effets de la matrice., Université de Rennes 1, Rennes (France).

Guart, A., Bono-Blay, F., Borrell, A. et Lacorte, S., 2011. Migration of plasticizersphthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 1-10.

Guillette, L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F. et Woodward, A.R., 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contamined and control lakes in Florida. Environmental Health Perspectives 102, 680-688.

Hall, J.M. et McDonnald, D.P., 1999. The estrogen receptor β-Isoform (ERβ) of the huma, estrogen receptor modulates ERα transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens Endocrinology 140(12), 5566-5578.

Harrison, A.G., Taylor, M.J., Scrivens, J.H. et Yates, H., 1997. Analysis of cyclic oligomers of poly(ethylene terephthalate) by liquid chromatography/mass spectrometry. Polymer 38(10), 2549-2555.

Hedenqvist, M. et Gedde, U.W., 1996. Diffusion of small-molecule penetrants in semicrystalline polymers. Progress in Polymer Science 21, 299-333.

Hennion, M.C., 1999. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. Journal of Chromatography A 856(1-2), 3-54.

Higuchi, A., Yoon, B.O., Kaneko, T., Hara, M., Maekawa, M. et Nohmi, T., 2004. Separation of endocrine disruptors from aqueous solutions by pervaporation: Dioctylphthalate and butylated hydroxytoluene in mineral water. Journal of Applied Polymer Science 94(4), 1737-1742.

Hiroi, H., Tsutsumi, O., Momoeda, M., Takai, Y., Osuga, Y. et Taketani, Y., 1999. Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha)and ERbeta. Endocrin Journal 46(6), 773-778.

Holland, B.J. et Hay, J.N., 2002a. Analysis of comonomer content and cyclic oligomers of poly(ethylene terephthalate). Polymer 43(6), 1797-1804.

Holland, B.J. et Hay, J.N., 2002b. The thermal degradation of PET and analogous polyesters measured by thermal analysis-Fourier transform infrared spectroscopy. Polymer 43(6), 1835-1847.

Huck, C.W. et Bonn, G.K., 2000. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. Journal of Chromatography A 885(1-2), 51-72.

ICPS, 2002. WHO/PCS/EDC/02.2, Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. International Programme on Chemical Safety. http://http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/ [consulté le 15 juillet 2011].

ILSI, 2003. Packaging Materials 4. Polyethylene for food packaging applications. International Life Science Institute. Bruxelles (Belgique).

ILSI, 2000. Packaging materials: 1. Polyethylene terephthalate (PET) for food packaging applications. International Life Science Institute. Bruxelles (Belgique).

ISO, 2009. ISO 877 : 2009. Plastics-Methods of exposure to direct weathering, to weathering using glass-filtered daylight and to intensified weathering by daymight using funnel mirrors.

ISO, 2003. ISO 17294-2: 2003. Qualité de l'eau. Application des la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS). Partie 2: Dosage de 62 éléments.

Jen, Z.C., 2002. Manufacturing method of copolyester for low acetaldehyde content of PET bottles., United States.

Jondeau, A., Dahbi, L., Bani-Estivals, M.-H. et Chagnon, M.-C., 2006. Evaluation of the sensitivity of three sublethal cytotoxicity assays in human HepG2 cell line using water contaminants. Toxicology 226(2-3), 218-228.

Kabuto, H., Amakawa, M. et Shishibori, T., 2004. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury under development of the brain and testis in mice. Journal of Life Science 74(24), 2931-2940.

Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, C., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T. et Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. Environmental Health Perspectives 104(4), 715-740.

Keresztes, S., Tatár, E., Mihucz, V.G., Virág, I., Majdik, C. et Záray, G., 2009. Leaching of antimony from polyethylene terephthalate (PET) bottles into mineral water. Science of the Total Environment 407(16), 4731-4735.

Kieber, R.J. et Mopper, K., 1990. Determination of picomolar concentrations of carbonyl compounds in natural waters, including seawater, by liquid chromatography. Environmental Science & Technology 24(10), 1477-1481.

Kirkland, D., Pfuhler, S., Tweats, D., Aardema, M., Corvi, R., Darroudi, F., Elhajouji, A., Glatt, H., Hastwell, P., Hayashi, M., Kasper, P., Kirchner, S., Lynch, A., Marzin, D., Maurici, D., Meunier, J.-R., Müller, L., Nohynek, G., Parry, J., Parry, E., Thybaud, V., Tice, R., van Benthem, J., Vanparys, P. et White, P., 2007. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 628(1), 31-55.

Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Vande Loock, K. et Decordier, I., 2011. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. Archives of Toxicology [Published online: 3 May 2011], DOI 10.1007/s00204-011-0691-4.

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., Von der Hude, W. et Wakata, A., 2000. Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. Environmental and Molecular Mutagenesis 35(3), 167-172.

Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. et Majer, B.J., 2004. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. Toxicology 198(1-3), 315-328.

Knasmüller, S., Parzefall, W., Sanyal, R., Ecker, S., Schwab, S., Uhl, C., Mersch-Sundermann, V., Williamsom, G., Hietsch, G., Langer, T., Darroudi, F. et Natarajan, A.T., 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens Mutation research 402, 185-202.

Knowles, B.B., Howe, C.C. et Aden, D.P., 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science 209, 497-799.

Konkol, L., 2004. Contaminants levels in recycled PET plastic, Swinburne University of Technology, Victoria (Australia).

Kovarskaya, B.M., Levantovska, I.I., Blyumenfel'd, A.B. et Dralyuk, G.V., 1968. Thermooxidative degradation of poly(ethylene terephthalate). Plasticheskie Massy 5, 42-46.

Kumaravel, T., Vilhar, B., Faux, S. et Jha, A., 2009. Comet Assay measurements: a perspective. Cell Biology and Toxicology 25(1), 53-64.

Lau, O.W. et Wong, S.K., 2000. Contamination in food from packaging material. Journal of Chromatography A 882, 255-270.

Launay, A., Thominette, F. et Verdu, J., 1999. Hydrolysis of poly(ethylene terephtalate). A steric exclusion chromatography study. Polymer Degradation and Stability 63(3), 385-389.

Launay, A., Thominette, F. et Verdu, J., 1994. Hydrolysis of poly(ethylene terephthalate): a kinetic study. Polymer Degradation and Stability 46(3), 319-324.

LC, 2009. Liquides & Conditionnement. Les bouteilles Volvic seront recyclées à l'usine de Limay, p. 12.

León-González, M.E. et Pérez-Arribas, L.V., 2000. Chemically modified polymeric sorbents for sample preconcentration. Journal of Chromatography A 902(1), 3-16.

Liangbin, L., Rui, H., Ai, L., Fude, N., Shiming, H., Chunmei, W., Yuemao, Z. et Dong, W., 2000. High pressure crystallized poly(ethylene terephthalate): high crystallinity and large extended-chain crystals. Polymer 41(18), 6943-6947.

Limm, W. et Hollifield, H.C., 1996. Modelling of additive diffusion in polyolefins. Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment 13(8), 949-967.

Liu, R., Zhou, J.L. et Wilding, A., 2004a. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds ans steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1022, 179-189.

Liu, R.Y.F., Hu, Y.S., Schiraldi, D.A., Hiltner, A. et Baer, E., 2004b. Crystallinity and oxygen transport properties of PET bottle walls. Journal of Applied Polymer Science 94(2), 671-677.

Loos, R., Hanke, G., Umlauf, G. et Eisenreich, S.J., 2007. LC-MS-MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters. Chemosphere 66(4), 690-699.

Lorusso, S., Gramiccioni, L. et Di Marzio, S., 1985. Acetaldehyde migration from poly(ethyleneterephthalate) (PET) containers. GC determination and toxicological assessment. Annali di Chimica 75(9-10), 403-414.

Loyo-Rosales, J.E., Rosales-Rivera, G.C., Lynch, A.M., Rice, C.P. et Torrents, A., 2004. Migration of Nonylphenol from Plastic Containers to Water and a Milk Surrogate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(7), 2016-2020.

Madigan, M. et Martinko, J., 2007. Brock, Biologie des micro-organismes, Pearson Education France, Paris (France).

Marco, Y., Chevalier, L. et Chaouche, M., 2004. Induced crystallization and orientation in PET under biaxial strain state. Cristallisation et orientation induites du PET sous sollicitations biaxiales 5(4), 497-505.

Marechal. E, G., P.H., Gupta V.B, Bashir, Z., 2002. Handbook of thermoplastic polyesters. Volume 1: Homopolymers and copolymers, Edited by Stoyko Fakirov, Wiley-VCH, Weinheim (Germany).

McNeal, T.P., Biles, J.E., Begley, T.H., Craun, J.C., Hopper, M.L. et Sack, C.A., 1999. Determination of suspected endocrine disruptors in foods and food packaging, pp. 33-52.

McNeill, I.C. et Bounekhel, M., 1991. Thermal degradation studies of terephthalate polyesters: 1. Poly(alkylene terephthalates). Polymer Degradation and Stability 34(1-3), 187-204.

Miller, P.E. et Denton, M.B., 1986. The Quadrupole Mass Filter: Basic Operations Concepts. Journal of Chemical Education 63(617).

Monarca, S., De Fusco, R., Biscardi, D., De Feo, V., Pasquini, R., Fatigoni, C., Moretti, M. et Zanardini, A., 1994. Studies of migration of potentially genotoxic compounds into water stored in pet bottles. Food and Chemical Toxicology 32(9), 783-788.

Monarca, S., Hongslo, A., Kringstad, A. et Carlberg, G.E., 1985a. Microscale fluctuation assay coupled sith Sep-Pak concentration as a rapid and sensitive method for screening mutagens in drinking water. Water Research 19, 1209-1216.

Monarca, S., Pasquini, R. et Scassellati Sforzolini, G., 1985b. Mutagenicity assessment of different drinking water supplies before and after treatments. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 34, 815-823.

Monteiro, M., Nerín, C. et Reyes, F.G.R., 1996. Determination of UV stabilizers in PET bottles by high performance-size exclusion chromatography. Food Additives and Contaminants 13(5), 575-586.

Monteiro, M., Nerín, C., Rubio, C. et Reyes, F.G.R., 1998. A GC/MS method for determining UV stabilizers in polyethyleneterephthalate bottles. HRC Journal of High Resolution Chromatography 21(5), 317-320.

Montuori, P., Jover, E., Morgantini, M., Bayona, J.M. et Triassi, M., 2008. Assessing human exposure to phthalic acid and phthalate esters from mineral water stored in polyethylene terephthalate and glass bottles. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 25(4), 511-518.

Muncke, J., 2009. Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source? Science of the Total Environment 407(16), 4549-4559.

Mutsuga, M., Kawamura, Y., Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., Takatori, K. et Tanamoto, K., 2006. Migration of formaldehyde and acetaldehyde into mineral water in polyethylene terephthalate (PET) bottles. Food Additives and Contaminants 23(2), 212-218.

Mutsuga, M., Tojima, T., Kawamura, Y. et Tanamoto, K., 2005. Survey of formaldehyde, acetaldehyde and oligomers in polyethylene terephthalate food-packaging materials. Food Additives and Contaminants 22(8), 783-789.

Naït-Ali, K.L., 2008. Le PET recyclé en emballages alimentaires: approche expérimentale et modélisation, Université Montpellier II.

Nawrocki, J., Dabrowska, A. et Borcz, A., 2002. Investigation of carbonyl compounds in bottled waters from Poland. Water Research 36(19), 4893-4901.

Negreira, N., Rodríguez, I., Ramil, M., Rubí, E. et Cela, R., 2009. Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandeme mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 638, 36-44.

Nerín, C., Albiñana, J., Philo, M.R., Castle, L., Raffael, B. et Simoneau, C., 2003a. Evaluation of some screening methods for the analysis of contaminants in recycled polyethylene terephthalate flakes. Food Additives & Contaminants 20(7), 668-677.

Nerín, C., Fernández, C., Domeño, C. et Salafranca, J., 2003b. Determination of potential migrants in polycarbonate containers used for microwave ovens by high-liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 5647-5653.

Newbold, R.R., Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E. et Haseman, J., 2004. Developmental exposure to diethylstilbestrol (DES) alters uterine response to estrogens in prepubescent mice: low versus high dose effects. Reproductive Toxicology 18(3), 399-406.

Nielsen, T. et Jägerstad, M., 1994. Flavour scalping by food packaging. Trends in Food Science & Technology 5(11), 353-356.

Nijssen, B., Kamperman, T. et Jetten, J., 1996. Acetaldehyde in mineral water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: Odour threshold and quantification. Packaging Technology and Science 9(4), 175-185.

Nishioka, K., Hirahara, A. et Iwamoto, E., 2002. Determination of antimony in polyethylene terephthalate bottles by graphite furnace atomic absorption spectrometry using microwave sample preparation Bull. Inst. Life Sci.Hiroshima Prefectural Women's Univ. 8, 35-42.

NRC, 1999. Hormonally active agents in the environment. National Academic Press. Washington (USA).

O'Neill, E.T., Tuohy, J.J. et Franz, R., 1994. Comparison of milk and ethanol/water mixtures with respect to monostyrene migration from a polystyrene packaging material. International Dairy Journal 4(3), 271-283.

OCDE, 1997. OCDE, n° 471. Lignes directrices pour les essais de produits chimiques / Section 4: Effets sur la santé. Essai N°471: Essai des mutation réverse dur des bactèries.

OCDE, 2010. OCDE, n° 487. Ligne directrice pour les essais des produits chimiques n°487. Essai *in vitro* de micronoyaux sur cellules de mammifères.

Oehlmann, J., Oetken, M. et Schulte-Oehlmann, U., 2008. A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption. Environmental Research 108(2), 140-149.

Ortmann, O., Sturm, R., Knuppen, R. et Emons, G., 1990. Weak estrogenic activity of phenol red in the pituitary gonadotroph: Re-evaluation of estrogen and antiestrogen effects. Journal of Steroid Biochemistry 35(1), 17-22.

Paci, M. et La Mantia, F.P., 1998. Competition between degradation and chain extension during processing of reclaimed poly(ethylene terephthalate). Polymer Degradation and Stability 61(3), 417-420.

Page, B.D. et Lacroix, G.M., 1995. The occurrence of phthalate ester and di-2-ethylhexyl adipate plasticizers in Canadian packaging and food sampled in 1985-1989: A survey. Food Additives and Contaminants 12(1), 129 - 151.

Patisaul, H.B., Fortino, A.E. et Polston, E.K., 2006. Neonatal genistein or bisphenol-A exposure alters sexual differentiation of the AVPV. Neurotoxicology and Teratology 28(1), 111-118.

Patisaul, H.B., Todd, K.L., A., M.J. et Adewale, H.B., 2009. Impact of neonatal exposure to the ERα agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats. Neurotoxicology 30(3), 350-357.

Pennarun, P.Y., 2001. Migration from recycled PET bottles. Elaboration and validation of a model usable of functionnal barriers, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims (France).

Pepin, D., Communal, P.Y. et Dupire, B., 1983. Study of mineral water conditionning in terephtalate polyethylene (French). Journal Français d'Hydrologie 14, 105-112.

Picard, M., 2008. Thèse. Evolution de la microstructure d'un PET lors du bi-étirage soufflage. Corrélation au durcissement structural, Ecole de Mines de Paris (France).

Pichon, V., 2006. Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques. Techniques de l'ingénieur P1420, 14 pp.

Pinto, B. et Reali, D., 2009. Screening of estrogen-like activity of mineral water stored in PET bottles. International Journal of Hygiene and Environmental Health 212(2), 228-232.

Psillakis, E. et Kalogerakis, N., 2003. Hollow-fibre liquid-phase microextraction of phthalate esters from water. Journal of Chromatography A 999, 145-143.

Reimann, C., Birke, M. et Filzmoser, P., 2010. Bottled drinking water: Water contamination from bottle materials (glass, hard PET, soft PET), the influence of colour and acidification. Applied Geochemistry 25(7), 1030-1046.

Richardin, P., 2001. La chromatographie en phase gazeuse: enroute vers un nouveau millenaire. Spectra Analyse 222, 19-26.

Romão, W., Franco, M.F., Corilo, Y.E., Eberlin, M.N., Spinacé, M.A.S. et De Paoli, M.A., 2009a. Poly (ethylene terephthalate) thermo-mechanical and thermo-oxidative degradation mechanisms. Polymer Degradation and Stability 94, 1849-1859.

Romão, W., Spinacé, M.A.S. et De Paoli, M.A., 2009b. Poly(ethylene terephthalate), PET: A review on the synthesis processes, degradation mechanisms and its recycling (Portuguese). Polímeros: Ciência e Tecnologia 19(2), 121-132.

Rule, M., Shi, Y. et Huang, X., 2001. Method to decrease the acetaldehyde content of melt-processed polyesters. United States Patent 6274212. Available: www.patents.com/us-6274212.html [accessed 16 October 2011].

Rurdell, M.S., Wagner, G.D. et Plewa, M.J., 2003. The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation ? Environmental and Molecular Mutagenesis 57(2), 168-174.

Sammon, C., Everall, N. et Yarwood, J., 1997. The diffusion of water into pet followed in-situ using FT-IR ATR. Macromolecular Symposia 119(1), 189-196.

Sánchez-Avila, J., Bonet, J., Velasco, G. et Lacorte, S., 2009. Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PAHs in an industrial sewage grid discharging to a Municipal Wastewater Treatment Plant. Science of the Total Environment 407(13), 4157-4167.

Sauvant, M.P., Pepin, D. et Bohatier, J., 1995. Chemical and in vitro toxicological evaluations of water packaged in polyvinyl chloride and polyethylene terephthalate bottles. Food Additives and Contaminants 12(4), 567-584.

Sax, L., 2010. Polyethylene terephthalate May yield endocrine disruptors. Environmental Health Perspectives 118(4), 445-448.

Scholz, S. et Klüver, N., 2009. Effects of endocrine disruptors on sexual , gonadal development in fish. Sexual Development 3(2-3), 136-151.

Scott, G., 1988. Migration and loss of antioxidants from polyethylene Food Additives & Contaminants 5(Supl. 1), 421-432.

Severin, I., Riquet, A.M. et Chagnon, M.C., 2011. Évaluation et gestion des risques-Matériaux d'emballage à contact alimentaire. Cahiers de Nutrition et de Diététique 46(2), 59-66.

Shi, Y., Liu, H.H. et Rule, M., 2004. Packaged potable liquid with UV absorber for reduced off-taste from closure and method. Publication, P.A. (ed), United States.

Shotyk, W. et Krachler, M., 2007. Contamination of bottled waters with antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) increases upon storage. Environmental Science and Technology 41(5), 1560-1563.

Shotyk, W., Krachler, M. et Chen, B., 2006. Contamination of Canadian and European bottled waters with antimony from PET containers. Journal of Environmental Monitoring 8(2), 288-292.

Simoneau, C., 2008. Chapter 21 Food Contact Materials, pp. 733-773.

Skjevrak, I., Brede, C., Steffensen, I.L., Mikalsen, A., Alexander, J., Fjeldal, P. et Herikstad, H., 2005. Non-targeted multi-component analytical surveillance of plastic food contact materials: Identification of substances not included in EU positive lists and their risk assesment. Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment 22(10), 1012-1022.

Skjevrak, I., Due, A., Gjerstad, K.O. et Herikstad, H., 2003. Volatile organic components migrating from plastic pipes (HDPE, PEX and PVC) into drinking water. Water Research 37, 1912-1920.

Skoog, D.A., West, D.M. et Holler, F.J., 1997. Chimie Analytique, 7ème édition, De Boeck & Larcier, Paris (France).

Sohoni, V.S. et Sumpter, J.P., 1998. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. Journal of endocrinology 158, 327-339.

Soto, A.M., Lin, T.M., Justicia, H., Silvia, R.M. et Sonnenschein, C., 1992. An 'in culture' bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E- SCREEN). Advances in Modern Environmental Toxicology 21, 295-309.

Stockfleth, J., Salamon, L. et Hinrichsen, G., 1993. On the deformation mechanisms of oriented PET and PP films underload. Colloid and Polymer Science, 423-435.

Strandberg, C. et Albertsson, A., 2008. Advances in Polymer Science. Springer, H., Germany (ed), pp. 117-157.

Stroheker, T., Cabaton, N., Nourdin, G., Régnier, J., Lhuguenot, J.C. et Chagnon, M.C., 2005. Evaluation of anti-androgenic activity of di-(2-ethylhexyl)phthalate. Toxicology 208(1), 115-121.

Stroheker, T., Picard, K., Lhuguenot, J.C., Canivenc-Lavier, M.C. et Chagnon, M.C., 2004. Steroid activities comparison of natural and food wrap compounds in human breast cancer cell lines. Food and Chemical Toxicology 42(6), 887-897.

Strube, A., Buettner, A. et Groetzinger, C., 2009. Characterization and identification of a plastic-like off-odor in mineral water. Water Science and Technology: Water Supply 9, 299-309.

Takeuchi, S., Lida, M., Kobayashi, S., Jin, K., Matsuda, T. et Kojima, H., 2005. Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors [alpha] and [beta], and androgen receptor. Toxicology 210(2-3), 223-233.

Tehrany, E.A. et Desobry, S., 2004. Partition coefficients in food/packaging systems: a review. Food Additives and Contaminants 21(12), 1186 - 1202.

Thurmann, E.M. et Mills, M.S., 1998. Solid-Phase Extraction-Principales and Practice, Wiley, New York, USA.

Tienpont, B., David, F., Dewulf, E. et Sandra, P., 2005. Pitfalls and Solutions for the Trace Determination of Phthalates in Water Samples. Chromatographia 61(7), 365-370.

Tombesi, N.B., Freije, R.H. et Augusto, F., 2004. Factorial experimental design optimization of solid phase microextraction (SPME) conditions for analysis of butylated hydroxytoluene (BHT) in bottled water. Journal of the Brazilian Chemical Society 15(5), 658-663.

Toyo'oka, T. et Oshige, Y., 2000. Determination of alkylphenols in mineral water contained in PET bottles by liquid chromatography with coulometric detection. Analytical Sciences 16(10), 1071-1076.

Tranchant, J., 1995. Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse. 4ème édition. Masson éditeurs, Paris (France).

Tsai, C.F., Shiau, H.W., Lee, S.C. et Chou, S.S., 2003. Determination of low-molecule-weight aldehydes in packed drinking water by high performance liquid chromatography. Journal of Food and Drug Analysis 11(1), 46-52.

USEPA, 1992. Method EPA 554. Determination of carbonyl compounds in drinking water by dinitrophenylhydrazine derivatization and high performance liquid chromatography.

Valentin-Severin, I., Laignelet, L., Lhuguenot, J.C. et Chagnon, M.C., 2002. Uridine uptake inhibition assay: an automated micromethod for the screening of cytotoxicity. Toxicology 171, 207-213.

Valentin, I., Philippe, M., Lhuguenot, J.-C. et Chagnon, M.-C., 2001a. Uridine uptake inhibition as a cytotoxicity test for a human hepatoma cell line (HepG2 cells): comparison with the neutral red assay. Toxicology 158(3), 127-139.

Valentin, I., Philippe, M., Lhuguenot, J.C. et Chagnon, M.C., 2001b. Uridine uptake inhibition as a cytotoxicity test for a human hepatoma cell line (HepG2 cells): comparison with the neutral red assay. Toxicology 158(3), 127-139.

Van Leeuwen, S.M., Hendriksen, L. et Karst, U., 2004. Determination of aldehydes and ketones using derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine and liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1058, 107-112.

Verdu, J., 2002. Différents types de vieillissement chimique des plastiques. Techniques de l'ingénieur AM3152, 14 p.

Verdu, J., 1990. Traité des matières plastiques: Vieillissement chimique. Techniques de l'ingénieur A3150.

Vigny, M., Tassin, J.F., Gibaud, A. et Lorentz, G., 1997. Study of molecular structure of PET films obtained by an inverse stretching process. Part 1: constant speed drawing of amorphous films. Polymer Engineering & Science 37, 1785-1794.

Villain, F., Coudane, J. et Vert, M., 1994. Thermal degradation of poly(ethylene terephthalate) and the estimation of volatile degradation products. Polymer Degradation and Stability 43(3), 431-440.

Villain, F., Coudane, J. et Vert, M., 1995. Thermal degradation of polyethylene terephthalate: study of polymer stabilization. Polymer Degradation and Stability 49(3), 393-397.

Vogel, M., Büldt, A. et Karst, U., 2000. Hydrazine reagents as derivatizing agents in environemental analysis - a critical review. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 366, 781-791.

Wagner, M. et Oehlmann, J., 2010. Endocrine disruptors in bottled mineral water: Estrogenic activity in the E-Screen. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology In Press, Corrected Proof.

Wagner, M. et Oehlmann, J., 2009. Endocrine disruptors in bottled mineral water: Total estrogenic burden and migration from plastic bottles. Environmental Science and Pollution Research 16(3), 278-286.

Wegelin, M., Canonica, S., Alder, C., Marazuela, D., Suter, M.J.F., Bucheli, T.D., Haefliger, O.P., Zenobi, R., McGuigan, K.G., Kelly, M.T., Ibrahim, P. et Larroque, M., 2001. Does sunlight change the material and content of polyethylene terephthalate (pet) bottles? Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA 50(3), 125-133.

Welle, F., 2011. Twenty years of PET bottle to bottle recycling - An overview. Resources, Conservation and Recycling (In press).

Westerhoff, P., Prapaipong, P., Shock, E. et Hillaireau, A., 2008. Antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water. Water Research 42(3), 551-556.

Wilkening, S., Stahl, F. et Bader, A., 2003. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. Drug Metabolism and Disposition 31(8), 1035-1042.

Wilson, V.S., Bobseine, K., Lambright, C.R. et Gray, L.E., 2002. A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonist. Toxicological Sciences 66, 69-81.

Wunderlich, B., 1980. Macromolecular Physics, Academic Press, New York, 1980.

Xie, Z., Selzer, J., Ebinghaus, R., Caba, A. et Ruck, W., 2006. Development and validation of a method for the determination of trace alkylphenols and phthalates in the atmosphere. Analytica Chimica Acta 565(2), 198-207.

Xu, L.C., Sun, H., Chen, J.F., Bian, Q., Qian, J., Song, L. et Wang, X.R., 2005. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. Toxicology 216(2-3), 197-203.

Yang, C.Z., Yaniger, S.I., Jordan, V.C., Klein, D.J. et Bittner, G.D., 2011. Most Plastic Products Release Estrogenic Chemicals: A Potential Health Problem That Can Be Solved. Environ Health Perspect.

Yang, J., Xia, Z., Kong, F. et Ma, X., 2010. The effect of metal catalyst on the discoloration of poly(ethylene terephthalate) in thermo-oxidative degradation. Polymer Degradation and Stability 95, 53-58.

Yang, M.S., Chan, H.W. et Yu, L.C., 2006. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determing the susceptibility of cells to oxidative stress. Toxicology 226(2-3), 126-130.

Zaki, O., 2008. Contribution à l'étude et à la modélisation de l'influence des phénomènes de transfert de masse sur le comportement mécanique de flocons en polypropylène, Université de Paris-Est, Paris (France).

Zhang, H. et Ward, I.M., 1995. Kinetics of hydrolytic degradation of poly(ethylene naphthalene-2,6-dicarboxylate). Macromolecules 28(23), 7622-7629.

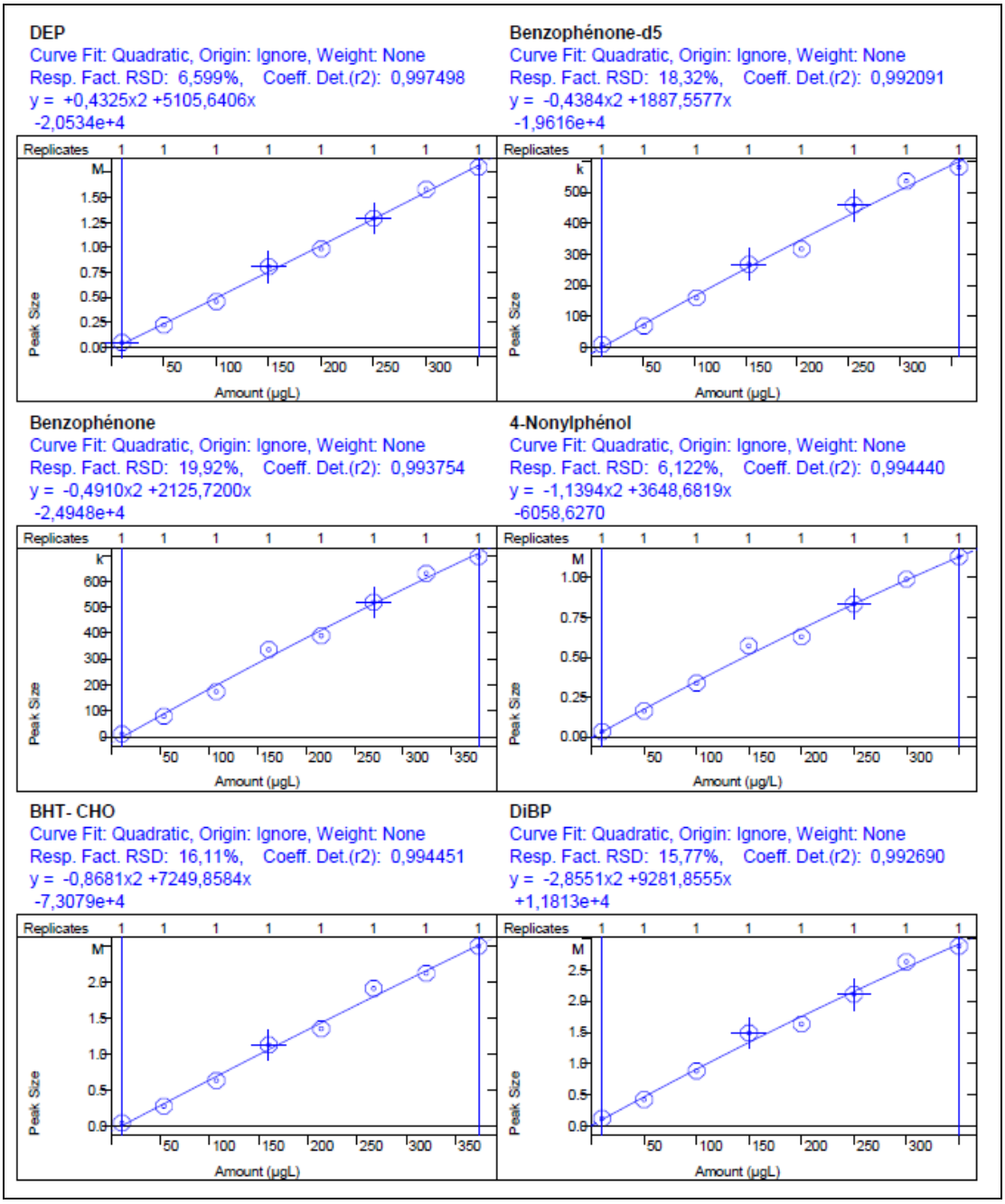
Zhang, Z., Ren, N., Li, Y.-F., Kunisue, T., Gao, D. et Kannan, K., 2011. Determination of Benzotriazole and Benzophenone UV Filters in Sediment and Sewage Sludge. Environmental Science & Technology 45(9), 3909-3916.

Zweifel, H., 2001. Handbook of Plastic Additives - 5e ed.Carl Hanser Verlag. Munich (Allemagne).

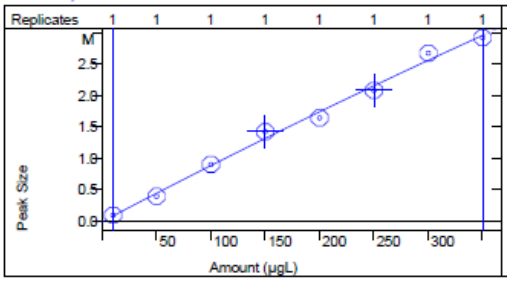
Zwiener, C., Glauner, T. et Frimmel, F.H., 2002. Method optimization for the determination of carbonyl compounds in desinfected water by DNPH derivatization and LC-ESI-MS-MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry 372(5-6), 615-621.

ANNEXES

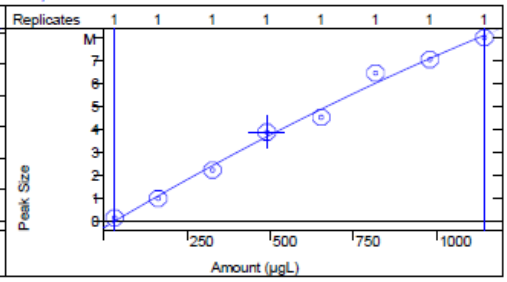
ANNEXE 1: Gammes d'étalonnage pour les 14 molécules de la méthode multi-résidus



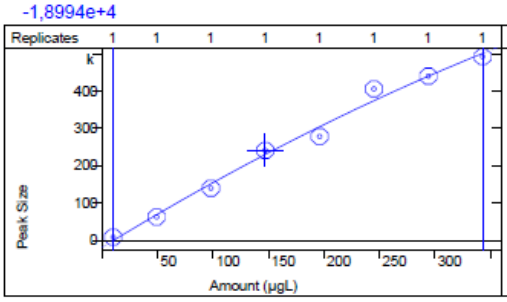
DBP
Curve Fit: Quadratic, Origin: Ignore, Weight: None
Resp. Fact. RSD: 7,574%, Coeff. Det.(r2): 0,994051
y = -1,7973x2 +9092,1846x
-5582,4365



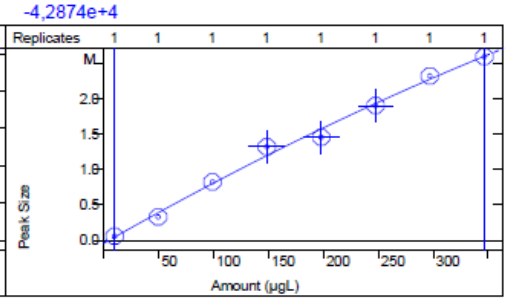
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate
Curve Fit: Quadratic, Origin: Ignore, Weight: None
Resp. Fact. RSD: 15,85%, Coeff. Det.(r2): 0,992412
y = -1,1567x2 +8661,8301x
-2,8246e+5



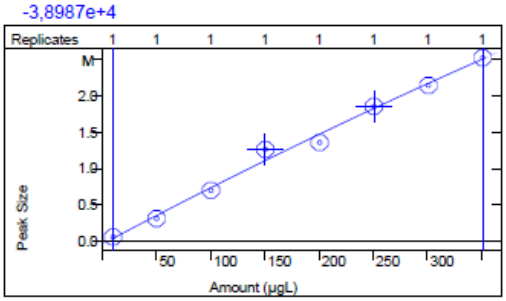
DEHA
Curve Fit: Quadratic, Origin: Ignore, Weight: None
Resp. Fact. RSD: 18,15%, Coeff. Det.(r2): 0,990530
y = -0,9053x2 +1827,6527x
-1,8994e+4



DEHP- d4
Curve Fit: Quadratic, Origin: Ignore, Weight: None
Resp. Fact. RSD: 12,50%, Coeff. Det.(r2): 0,993684
y = -3,5968x2 +8860,4414x
-4,2874e+4



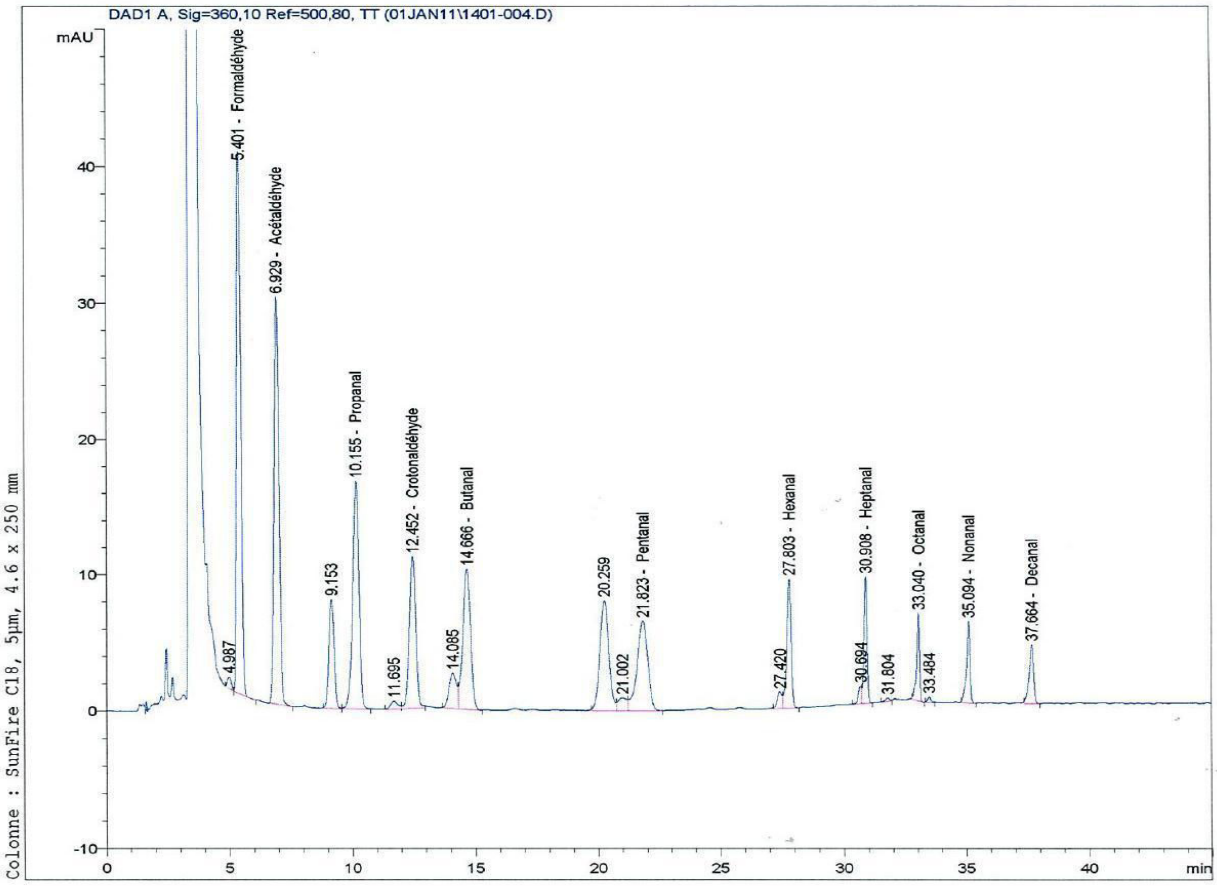
DEHP
Curve Fit: Quadratic, Origin: Ignore, Weight: None
Resp. Fact. RSD: 10,80%, Coeff. Det.(r2): 0,992265
y = -1,9217x2 +7941,1675x
-3,8987e+4



ANNEXE 2: Produits chimiques et matériel utilisés dans la méthode de dosage des aldéhydes

- Le mélange de composés carbonylés (formaldéhyde, acétaldéhyde, propanal, butanal, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, crotonaldéhyde) est fourni en solution à la concentration de 1,0 mg/mL dans le mélange AcCN par la société Techlab. Les 11 composés dérivatisés (composés carbonylés-2,4-DNPH) à la concentration de 1,0 mg/mL dans le mélange MeOH/AcCN (95:5), sont fournis par la même société.
- La 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH) (réactif de dérivatisation) est fournis en poudre, pure à 99,5% (Water added) par la société CHEM SERVICE.
- L'eau ultra pure (EUP) utilisée pour préparer les échantillons synthétiques, la phase mobile et les solutions, est produite au laboratoire avec un Sartorius Arium 611UV associé à un osmoseur Millipore Elix5.
- L'acétonitrile (AcCN) HPLC gradient utilisé pour préparer les solutions standards, la solution de dérivatisation et la phase mobile pour la séparation chromatographique est fournis par la société Carlo Erba SDS.
- Les Cartouches C18 Sep-Pak Var 6cc (500mg) et les Cartouches Oasis HLB 5cc (200 mg LP) utilisées pour l'extraction sur phase solide sont fournies par la société Waters.
- L'acide citrique (99,5%) utilisé pour préparer la solution de tampon citrate à pH 3 est fourni par la société ACROS ORGANICS.
- Le tri-sodium citrate utilisé pour préparer la solution de tampon citrate à pH 3 est fourni par la société VWR.
- L'acide orthophosphorique (85%) utilisé pour acidifier l'eau est fourni par la société Riedel-de Haën.
- Unité d'extraction MACHEREY-NAGEL à 24 positions, pour la SPE manuelle.

ANNEXE 3: Chromatogramme des 11 aldéhydes à 4 µg/L dans l'eau embouteillée. La méthode d'analyse consiste en la dérivation chimique des aldéhydes avec 2,4-DNPH, suivie d'une SPE et analyse par HPLC-DAD



ANNEXE 4: Validation de la gamme d'étalonnage du formaldéhyde

Etude de l'étalonnage de la méthode

Tableau de signal :

Jour différent	Niv 1	Niv 2	niv 3	Niv 4	Niv 5	y=a0+a1x	
	3,5	5	6	8	10	a0	a1
J1	391,23	624,63	693,84	906,54	1156,24	17,2222	113,4267
J2	354,79	595,62	672,4	937,29	1123,78	-24,5152	117,1217
J3	411,76	595,62	701,87	987,57	1215,4	-31,4585	125,2158
J4	414,85	618,58	703,74	951,77	1227,19	-16,4065	123,0204
J5	394,16	596,74	679,07	911,82	1153,84	-0,1353	114,9633

Tableau des grandeurs retrouvées :

Jour différent	Niv 1	Niv 2	niv 3	Niv 4	Niv 5
	3,5	5	6	8	10
J1	3,297	5,355	5,965	7,840	10,042
J2	3,239	5,295	5,950	8,212	9,804
J3	3,540	5,008	5,857	8,138	9,958
J4	3,506	5,162	5,854	7,870	10,109
J5	3,430	5,192	5,908	7,933	10,038

Représentation graphique des grandeurs retrouvées par rapport aux grandeurs théoriques et à la droite $\hat{X} = X$

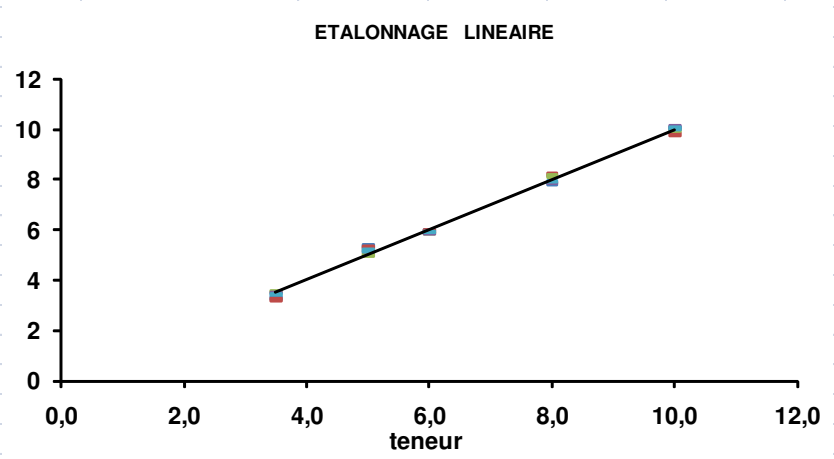


Tableau des biais absolus par rapport aux valeurs théoriques

Jour différent	Niv 1	Niv 2	niv 3	Niv 4	Niv 5
	3,5	5	6	8	10
J1	-0,203	0,355	-0,035	-0,160	0,042
J2	-0,261	0,295	-0,050	0,212	-0,196
J3	0,040	0,008	-0,143	0,138	-0,042
J4	0,006	0,162	-0,146	-0,130	0,109
J5	-0,070	0,192	-0,092	-0,067	0,038
Moyenne des biais	-0,098	0,202	-0,093	-0,001	-0,010
Ecart type des biais	0,130	0,134	0,052	0,167	0,117

Tableau des biais relatifs par rapport aux valeurs théoriques

Jour différent	Niv 1	Niv 2	niv 3	Niv 4	Niv 5
	3,5	5	6	8	10
J1	-5,79%	7,10%	-0,58%	-1,99%	0,42%
J2	-7,47%	5,90%	-0,83%	2,65%	-1,96%
J3	1,13%	0,16%	-2,39%	1,73%	-0,42%
J4	0,16%	3,23%	-2,44%	-1,62%	1,09%
J5	-2,01%	3,84%	-1,53%	-0,84%	0,38%

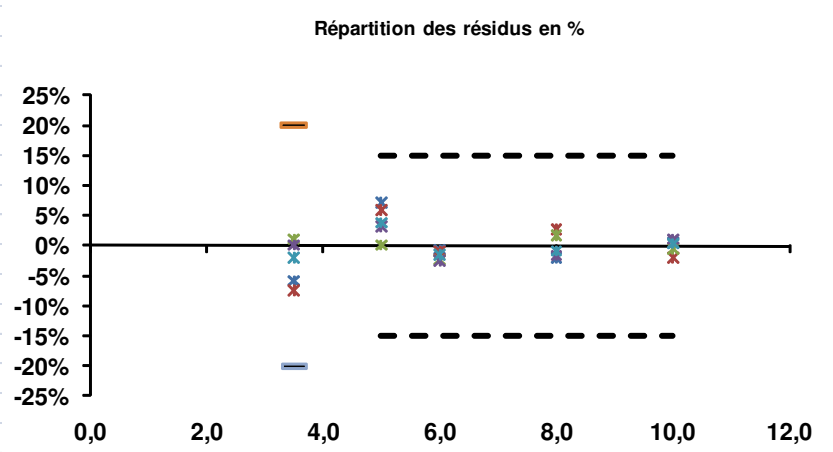
Nombre de niveaux	5
Nombre de gammes	5

Etude de la fonction d'étalonnage de la méthode d'analyse avec un test d'adéquation

Sources de variation	Sommes des carrés d'écarts	Degrés de liberté	Variance	Critère calculé	Valeur critique au risque alpha = 1%
Modèle	0,296348465	5	0,05926969	3,75	4,10
Expérimentale	0,31571851	20	0,01578593		
Totale	0,612066975	25			

Etude de la fonction d'étalonnage de la méthode d'analyse avec des EMAétalonnage

EMAétalonnage	20%	pour l'étalon situé à la LQ
EMAétalonnage	15%	pour les autres étalons de l'étalonnage



ANNEXE 5: Validation de la limite de quantification du formaldéhyde

Etude de la limite de quantification de la méthode

Tableau de résultat

Série	Répétitions		Statistiques élémentaires	
	1	2	Moyenne	s^2
06/12/2010	4,1	4,1	4,1	0
07/12/2010	3,8	3,8	3,8	0
08/12/2010	3,5	3,4	3,45	0,005
13/12/2010	3,4	3,4	3,4	0
14/12/2010	3,1	3,1	3,1	0

Paramètres d'exactitude de la limite de quantification présupposée

Nombre de série : n	5
Nombre de répétitions par série : r	2
Variance de répétabilité : Srépét2	0,001
Variance des moyennes : $s(\bar{z}i)^2$	0,1495
Variance inter-séries : s_B^2	0,149
Variance de fidélité intermédiaire : s_{LQ}^2	0,15
Moyenne générale : $\overline{\overline{z_{LQ}}}$	3,57
Ecart-type de fidélité intermédiaire : s_{LQ}	0,387298335
CV de fidélité intermédiaire en % : CV_{LQ}	10,8%
Réf	3,5
EMA = 60% x Réf	2,1
LQ+60%xLQ	5,6
$\overline{\overline{z_{LQ}}} + 2 \times s_{LQ}$	4,344596669
$\overline{\overline{z_{LQ}}} - 2 \times s_{LQ}$	2,795403331
LQ-60%xLQ	1,4

ANNEXE 6: Procédure suivi pour le dosage de l'antimoine dans le PET

SCP SCIENCE
Application Note: Determination of Plastics for Cd, Cr, Pb, and Hg

Sample Type: Polyethylene Sample Weight: 0.5 g

INTRODUCTION:

There is growing pressure on industry to reduce certain key metals in plastic housings and electronic/electrical components for both consumer and industrial products. In the European Union, the Waste from Electrical and Electronic Equipment (**WEEE**) and the Reduction of Hazardous Substances (**RoHS**) Directives has targeted Cr^{VI}, Cd, Hg, and Pb. The legislation, 94/62/EC, specifically requires that these metals be monitored due to the quantities of electronics that end up as scrap in landfill sites. A target date of July 2006 has been set whereby these metals must be below accepted levels when producing new electronic equipment.

Plastics such as, Polyethylene, are being monitored for the above metals. Using conventional hotplate techniques, these polymers are often difficult to decompose without the accompanying loss of analytes due to the high temperatures involved.

This application note describes the use of a high temperature graphite block (DigiPREP HT) for sample preparation. European Reference Materials EC680 and EC681 Certified Plastic were used as reference materials.

SUPPLIES AND REAGENTS:

1) A 250 ml borosilicate *Digi***TUBE** (020-520-031)
2) *Digi***PREP HT 250** 010-520-222
3) Touch Screen Controller 010-500-225
4) Boiling Rods (Package of 40) 010-520-302
5) Analytical Balance
6) Calibrated Class "A" Volumetric Flask (50ml)
7) Boiling Rods
8) H_2SO_4 (98%) 10ml
9) HNO_3 (70%) 5ml
10) H_2O_2 (30%) 20ml
11) WEEE RoHS Releasing Reagent 250-240-103
12) Single Element Certified ICP-AES Standard 1000 ppm Cd, Cr, Pb, and Hg

SAMPLE PREPARATION PROCEDURE:

The Sample: Cut the sample into small pieces and weigh out 0.5 g. Place the sample in the 250 ml Digestion Tube. Add 10 ml H_2SO_4 (98%). Place the tubes in the rack. The rack should then be placed on the *Digi***PREP HT.** Each sample batch should include a blank in duplicate and a spike recovery in duplicate. Add 0.5 ml of WEEE-RoHS Releasing Reagent to all tubes. The Hg and Pb should be in form of stable sulfate salts.

The Blank: The blank consist of the acids added to the tube without any sample.

The Method Validation: The method is validated using spiked recoveries and Certified Reference Materials. One milliliter of a certified spectrochemical single element standard for each element is added to a sample (see above). The spiked sample is then processed through the digestion procedure.

The recoveries must be between 80 and 125% for each trace element for the method to be validated.

The Digestion Procedure:
The tubes should be identified on the rack. The rack should be placed on the HT and the temperature profile found in Table 1 is initially used.

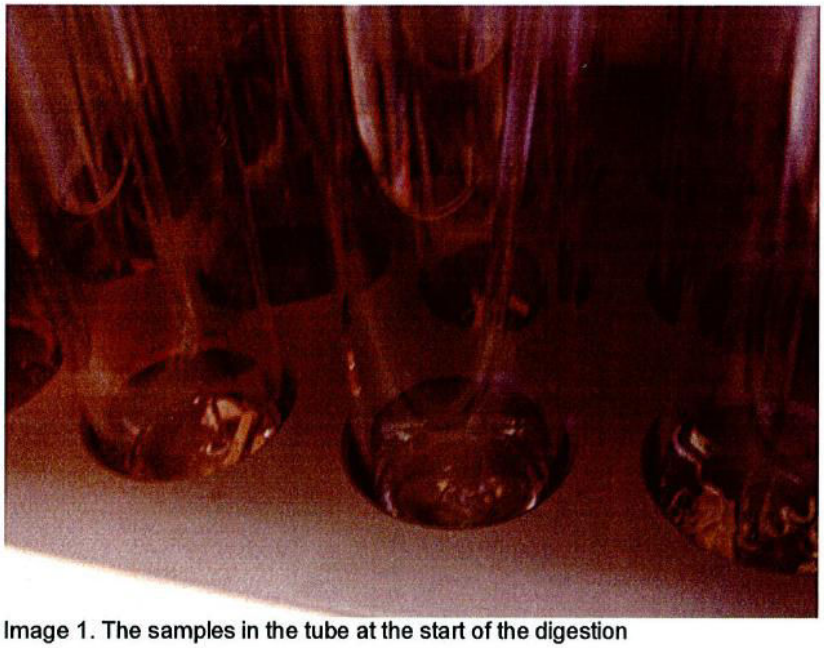


Image 1. The samples in the tube at the start of the digestion

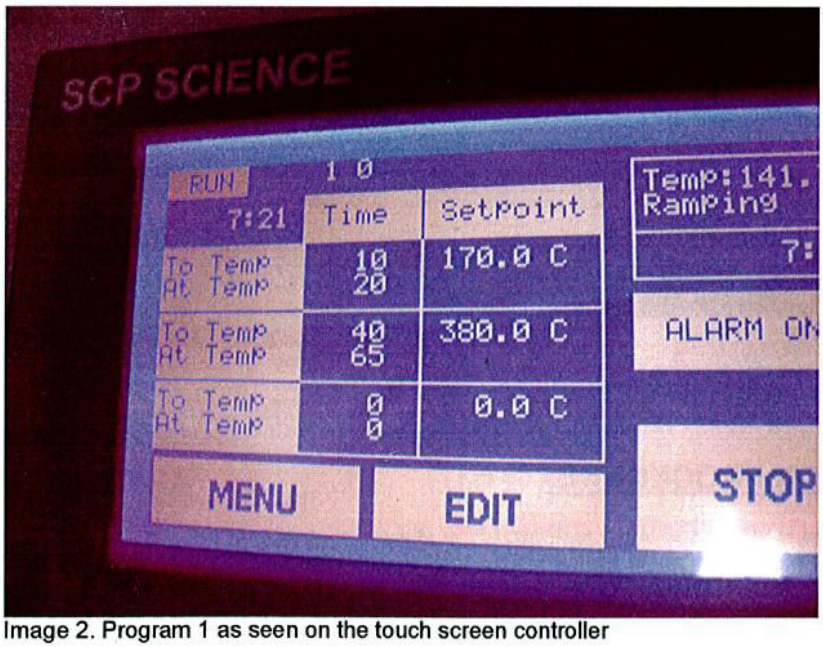


Image 2. Program 1 as seen on the touch screen controller

Table 1. Program 1-Temperature Profile for H_2SO_4

Temperature (°C)	Time (min)	Ramp/Hold
170	25	Ramp
170	10	Hold
340	40	Ramp
340	65	Hold

The sample will continue to digest until the white fumes are formed. The digestion should be continued until 1 ml or less remains in each tube. The samples are then cooled to room temperature.

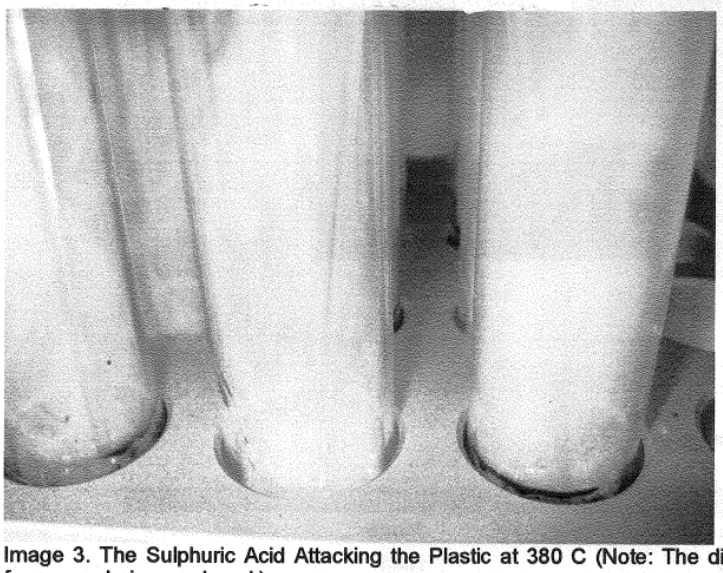


Image 3. The Sulphuric Acid Attacking the Plastic at 380 C (Note: The digestion is complete when no more fumes are being produced.)

H_2O_2 is then added in 5ml aliquots (The reaction will be quite vigorous). It should be added four times. The reaction should be allowed to diminish after each addition. When the reaction at room temperature has diminished. The sample is placed in the *Digi*PREP HT using the temperature profile found in Table 2.

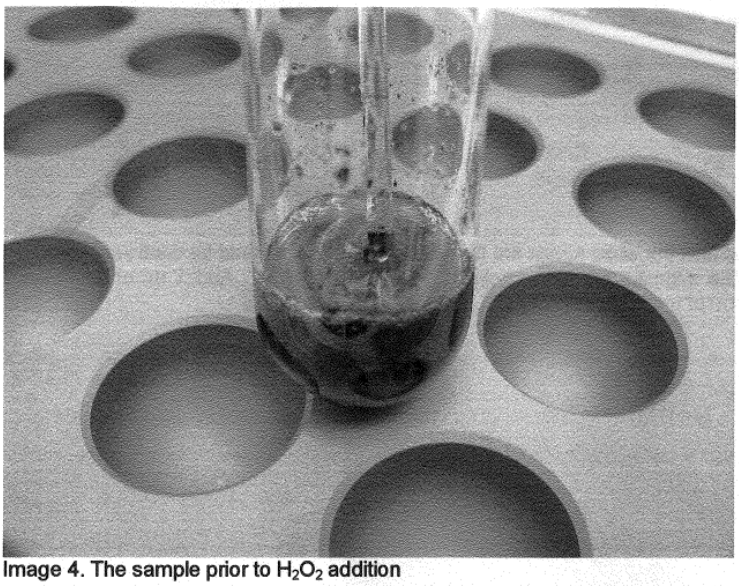


Image 4. The sample prior to H_2O_2 addition

Table 2. Program 2-Temperature Profile for H_2O_2

Temperature (°C)	Time (min)	Ramp/Hold
160	20	Ramp
160	20	Hold
240	15	Ramp
240	25	Hold

The volume should be reduced to below 10 ml. The samples should then be cooled to room temperature. HNO_3 is then added in 1 ml aliquots. A maximum of 5 ml of HNO_3 should be added. The reaction should be allowed to diminish. The sample is then placed on the *Digi*PREP HT using the temperature profile found in Table 3.

Table 3. Program 3-Temperature Profile for HNO_3

Temperature (°C)	Time (min)	Ramp/Hold
120	20	Ramp
120	30	Hold

The samples should be allowed to cool to room temperature and transferred to a 50 ml volumetric flask. The digestion tube should be washed three times with De-ionized water. The wash should also be transferred to the volumetric Flask.

Nancy-Université
INPL

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur Roland SEGUELA, Directeur de Recherche, INSA de Lyon, Villeurbanne

Monsieur Patrick MAZELLIER, Professeur, Université de Bordeaux, Périgueux

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame BACH CAMPA Cristina

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Evaluation de la migration des constituants de l'emballage en poly(éthylène téréphtalate) (PET) vers l'eau, des facteurs d'influence et du potentiel toxique des migrats. "

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Intitulé du doctorat : **« Sciences des Matériaux »**

Fait à Vandoeuvre, le 08 novembre 2011
Le Président de l'I.N.P.L.,
F. LAURENT

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE - NANCY

LE DEVELOPPEMENT DURABLE c'est aussi notre culture

Institut National Polytechnique de Lorraine
inpl@inpl-nancy.fr | www.inpl-nancy.fr

2 av. de la Forêt de Haye | BP 3
54501 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex
FRANCE
Tél. : +33(0)3 83 59 59 59
Fax : +33(0)3 83 59 59 55

Evaluation de la migration des constituants de l'emballage en poly(éthylène téréphtalate) (PET) vers l'eau, des facteurs d'influence et du potentiel toxique des migrats

Résumé

Le poly(éthylène téréphtalate) (PET) est largement utilisé pour le conditionnement des eaux. L'évaluation de l'inertie des matières plastiques au contact de denrées alimentaires est régie par le règlement européen N°10/2011 qui permet d'assurer la sécurité sanitaire des matériaux. Cependant, plusieurs études ont rapporté des effets cyto/génotoxiques et/ou œstrogéniques des eaux embouteillées en PET. Ces réponses ont été attribuées à des mélanges de composés provenant du matériau polymère. L'objectif de ce travail de recherche a été d'apprécier les phénomènes de migration de monomères, catalyseurs, d'additifs et de néoformés du PET vers l'eau.

Conformément aux formulations déclarées pour la fabrication des bouteilles en PET, aucune présence de phtalates, d'antioxydants et de stabilisants UV a été détectée dans l'eau. Cependant, la présence de formaldéhyde, d'acétaldéhyde, du 2,4-di-*tert*-butylphénol et d'antimoine dans l'eau embouteillée en PET a été confirmée. Il a été mis en évidence que la température influence la migration de ces molécules due à une perte d'orientation de la phase amorphe sur la partie semi-cristalline de la bouteille PET. Cela entraine une augmentation de la mobilité des chaînes polymériques. Ainsi, il a été montré que l'exposition solaire n'influence que la migration du formaldéhyde. En effet, aucune oxydation des chaînes polymériques n'a été détectée en surface de bouteilles après irradiation naturelle. L'étude toxicologique *in vitro* sur des modèles cellulaires humains (cellules HepG2 et MDA-MB453-kb2) n'a pas mis en évidence de cytotoxicité, de génotoxicité et d'activité de type œstrogénique et (anti)-androgénique dans l'eau embouteillée en PET.

Mots clés: PET, eau embouteillée, migration, génotoxicité, perturbateur endocrinien, synchrotron, diffraction X, relaxation structurale.

Assessments of chemical mixtures leaching from polyethylene terephthalate (PET) bottles into drinking water and their potential toxicity

Abstract

Polyethylene terephthalate (PET) is widely used for the manufacture of packaging for drinking water. The chemical safety of plastic materials intended to come into contact with food is strictly regulated by the European regulation No. 10/201, which establishes a positive list of authorized compounds for the production of plastic packaging. Despite this, cyto-/genotoxic and estrogenic activity of PET-bottled water has been reported. Chemical mixtures migrating from PET into bottled water may explain the reported positive results. The aim of this study was to assess the migration of monomers, catalysts, additives, and degradation byproducts from PET into bottled water.

In accordance with the chemical formulations reported for PET, no phtalates, antioxidants, and UV stabilizers were detected into bottled water. However, formaldehyde, acetaldehyde, 2,4-di-tert-butylphenol and antimony were found in PET bottled water. It was shown that temperature influences the migration of these compounds, due to orientation loss of the amorphous phase of the semi-crystalline part of PET bottles. This phenomenon increases the mobility of polymer chains and consequently, the compounds' diffusion. Thus, it was found that sunlight exposure influences only the migration of formaldehyde. Indeed, no oxidation of the polymer chains was detected on the surface of PET bottles after exposure. The in vitro toxicological bioassays with human cell models (HepG2 and MDA-MB453-KB2 cells) did not show any cytotoxicity, genotoxicity or estrogenic- and (anti)-androgenic-like activity for PET bottled water.

Keywords: PET, bottled water, migration, genotoxicity, endocrine disruptors, synchrotron, X-ray scattering, structural relaxation.