

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة البليدة 1
UNIVERSITE BLIDA 1



FACULTE DE TECHNOLOGIE
DEPARTEMENT GENIE DES PROCÉDES
PROJET DE FIN D'ETUDES

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER
Procédés De Traitement des Effluents et Protection de
l'Environnement (P.T.E.P.E)

THEME

***ETUDE DE LA REPROTOXICITE A FAIBLE DOSE DE
DI(ETHYLHEXYL) PHTALATE ET SUIVI DE LA CINETIQUE
DE SA MIGRATION.***

- **Réalisé par :**

M^{elle} OUDIR Malha

- **Encadré par :**

M^{me} AIT MESBAH Z, MAA à

USDB

- **Co-promotrice :**

AZINE K, responsable du

laboratoire pharmacotoxicologie CRD

SAIDAL.

Devant le jury composé de:

Président ;

- S. Moulay : Professeur à USDB

Examineurs ;

- O. Bouras : Maitre de conférences à USDB
- B. Bouzid : Maitre de conférences à USDB

Année universitaire 2013/2014

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Centre de Recherche et de Développement (CRD) SAJDAL. Durant toute cette période j'ai eu la chance de rencontrer plusieurs personnes qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail, qui m'ont conseillée et surtout qui m'ont beaucoup apporté dans tous les sens du terme.

Mes remerciements s'adressent dans un premier temps à l'ensemble des membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.

J'exprime ma grande reconnaissance et mes sincères remerciements à ma promotrice Mme AIT MESBAH Z pour ses conseils avisés durant ce travail et la confiance qu'elle m'a accordée.

J'exprime ma grande reconnaissance et mes sincères remerciements à Mr BOUZID de m'avoir bien accepté dans son master.

Ma sincère reconnaissance et mes vifs remerciements à Mr BOURAS pour ses conseils et ses encouragements.

Je remercie vivement ma copromotrice Mme AZINE K, responsable du laboratoire pharmacotoxicologie de CRD pour m'avoir accueilli au laboratoire pharmacotoxicologie, pour sa gentillesse et ses conseils.

Je tiens à remercier la société ENPC notamment Mme MENASRIA directrice du département technique, d'avoir accepté me fournir les matières premières (PVC et DEHP) nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude et mes remerciements à Mr BOUZIANE M, l'animalier de CRD pour son aide et ses conseils durant toute la durée de mon stage.

Je tiens aussi à adresser ma gratitude à Mme TOUAZI de CRD pour son aide et ses conseils.

Ma sincère reconnaissance et mes vifs remerciements à Mr SCHADER, le chef de service de laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques (LNCP) de m'avoir accueilli au laboratoire pour réaliser l'étape de déshydratation des organes, pour sa confiance et surtout pour ses conseils. Je remercie également tout le personnel du laboratoire tout particulièrement Melle AMI, Mr ABD ELGHANI et Dr ALOUACHE pour leur aide.

J'exprime ma grande reconnaissance et mes sincères remerciements à Mr Grib de m'avoir aidé à faire les analyses FTIR.

Je remercie chaleureusement Mr ABD ELOUAHID pharmacien toxicologie à l'institut Pasteur d'Algérie pour l'intérêt qui a porté à mon travail, pour son aide, pour ses conseils et son encouragement.

Je remercie également Mr NOUAS, responsable de service contrôle à l'institut Pasteur Algérie, et pour ses conseils.

Je souhaiterais finir en remerciant toutes les personnes qui m'ont encouragé pour finir ce travail.

Glossaire

- **Cancérogénicité** : Les produits chimiques sont définis comme cancérogènes s'ils induisent des tumeurs, une augmentation de leur incidence et/ou de leur caractère malin, ou s'ils diminuent la durée de leur apparition.
- **Cryptorchidie** : Malformation du l'appareil reproducteur male caractérisée par la non descente du testicule dans le scrotum.
- **DJT** : La **D**ose **J**ournalière **T**olérable représente la quantité d'une substance qu'un individu moyen de 60 kg peut théoriquement ingérer quotidiennement, sans risque pour la santé. Elle est habituellement exprimée en mg de substance par kg de poids corporel.
- **Gamétogenèse** : Processus qui aboutit, au cours de la vie d'un organisme, à la formation des cellules reproductrices, les gamètes.
- **Hypospadias** : Est le développement anormal du pénis sur lequel l'orifice, ou méat urétral, ne se localise pas à l'extrémité du gland pénien.
- **LOAEL** : « *lowest observable adverse effect level* » ; c'est la dose minimale qui provoque des effets toxiques.
- **Mutagénicité** : Correspond à l'induction de modifications permanentes transmissibles dans la quantité ou la structure du matériel génétique de cellules ou d'organismes. Ces modifications peuvent intervenir sur un seul gène, un ensemble de gènes ou sur des chromosomes.
- **NOAEL** : « *no observable adverse effect level* » ; c'est la dose maximale sans effets toxiques.
- **Stéroïdogénèse** : Processus de synthèse des hormones stéroïdiennes, la principale étant la testostérone. Cette hormone est responsable de la masculinisation chez le fœtus et de l'établissement et du maintien des caractères sexuels secondaires males et de la spermatogenèse chez l'adulte.
- **Tératogénicité** : *Tératogène* : Mutagène agissant spécifiquement sur l'embryon ou le fœtus.
- **Toxicité aiguë** : La toxicité aiguë concerne les effets néfastes qui peuvent résulter d'une exposition unique, ou d'expositions multiples en l'espace de 24 heures, à une substance, l'apparition de la toxicité est de courte durée, l'absorption du toxique et les manifestations d'intoxication sont rapides.

- **Toxicité chronique** : toxicité réitérée pendant plus de 90 jours. Dans le cas d'une intoxication chronique, les expositions sont répétées sur de longues périodes, la manifestation de l'intoxication dépend soit du poison qui s'accumule, soit des effets engendrés qui s'additionnent.
- **Toxicité par dose répétée** : La toxicité par dose répétée correspond aux effets toxiques généraux qui se produisent consécutivement à une exposition journalière répétée d'une substance durant une partie (exposition subaiguë ou subchronique) ou la majorité (exposition chronique) de la durée de vie.
- **Toxicité pour la reproduction** : Elle se caractérise par des domaines de préoccupation multiples, tels que les dommages aux fonctions ou capacité de reproduction male et femelle (fertilité), l'apparition d'effets nocifs non héréditaires dans la progéniture (toxicité pour le développement) ainsi que les effets sur ou médiés par la lactation/l'allaitement.
- **Toxicité subaiguë** : toxicité réitérée pendant au maximum 28 jours. L'intoxication subaiguë correspond à des expositions fréquentes et répétées sur une période de plusieurs jours ou semaines pour que les symptômes d'intoxication apparaissent.
- **Toxicité subchronique** : toxicité réitérée pendant plus de 28 jours et moins de 90 jours.
- **Toxicocinétique** : La toxicocinétique est le devenir du toxique dans l'organisme ; l'expression de la toxicité suite à l'exposition à une substance est la conséquence d'une chaîne d'événements qui se produisent dans les tissus concernés de l'organisme, en contact avec le toxique ultime dans des quantités qui provoquent un effet néfaste. La concentration du toxique ultime au niveau de la cible biologique dépend de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة يتمثل في تقدير الاثار السمية للمادة الملينة للبلاستيك على الوظيفة التكاثرية و تطوير منهجية بسيطة و فعالة لمراقبة انتقال هذه المادة من مواد التغليف المصنوعة من PVC الى بعض السوائل ممثلي الاغذية. في الجزء الاول من هذا العمل قمنا بدراسة اثار التعرض للمادة الملينة للبلاستيك على جرعات خفيفة خلال فترة الحمل عند ذكر الفأر و النتائج اظهرت تخريب كبير في الجهاز التكاثرى . من خلال الجزء الثاني من الدراسة استعملنا تقنية الاشعة فوق البنفسجية و فوق الحمراء لمراقبة انتقال المادة الملينة من شرائح PVC الى الاثانول , الاثانول المميح و الماء المقطر . التقنيتان كشفتنا على نتائج متباينة : الاشعة فوق البنفسجية عندها جانب سيئ و هو تجمد الملمن في المياه و نقص الحساسية , تقنية الاشعة ما فوق الحمراء مهمة نظرا لاستعمالها المباشر للعينة لكن عندها جانب سيئ يتمثل في انسلال المحلول إلى داخل الشرائح البلاستكية.

Résumé

Dans la première partie de ce travail nous avons étudié l'effet d'une exposition *in utero* à une faible dose DEHP (4 mg/kg/j) par un gavage quotidien pendant toute la période de gestation sur l'appareil reproducteur de la descendance male chez le rat Wistar. Nos résultats ont montré une altération importante du système de reproduction à savoir : Diminution de la DAG, du poids testiculaire et une défaillance hormonale sexuelle. Ces résultats fournissent une nouvelle preuve sur les effets à faibles doses et remettent en cause la NOAEL (5mg/kg/j) fixée par la réglementation.

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons appliqué des méthodes spectrophotométriques UV visible et FTIR à la caractérisation du DOP et au suivi de sa migration à partir de films fins en PVC vers les milieux simulants de denrées alimentaires et l'influence de certains facteurs sur ce phénomène.

Les résultats ont montré que les deux techniques permettent une bonne caractérisation et le suivi de la migration dans le cas d'un flux de migration important mais elles restent limitées par manque de sensibilité dans le cas d'un flux de migration faible.

Mots clés : DEHP ; Faibles doses ; reprotoxicité ; PVC, Migration.

Abstract

In utero di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) exposure was examined in time-mated Wistar rats gavaged during gestation period with doses 4 mg/kg-d, in the first part of this study.

At a low dose of 4 mg/kg-d, DEHP caused adverse anti-androgenic effects on male rat development as male anogenital distance, testis weight and testosterone was decreased. The results provide new evidence of low-dose effects of DEHP and are consistent with the EU NOAEL of 5 mg/kg for DEHP.

In the second part of this study we applied spectrophotometric methods UV visible and FTIR/ATR in the characterization of the DOP and in the follow-up of its migration leave in fine PVC films towards the simulants of foods and the influence of certain factors on this phenomenon.

The results showed that the two technics allow a good characterization and the follow-up of the migration in the case of a significant flow of migration but they remains limited for lack of sensitivity in the case of a low flow of migration.

Keywords: DEHP; toxicity; Male offspring rats; Low dose; PVC, Migration

Liste des figures

Figure 1 : Formule chimique générale du PVC	5
Figure 2 : Schéma des différentes interactions possibles entre l’emballage, son contenu et le milieu extérieur	12
Figure 3 : Schématisation de la plastification des polymères	14
Figure 4 : Les sources et voies d’exposition environnementales aux phtalates	30
Figure 5 : Effet d’une exposition <i>in utero</i> à 4 mg/kg/j de DEHP sur l’évolution pondérale des rats mâles au 21JPN	45
Figure 6 : Effet d’une exposition <i>in utero</i> à 4mg/kg/j de DEHP sur la DAG chez le rat mâle au 21 JPN	46
Figure 7 : Effet d’une exposition <i>in utero</i> à 4mg/kg/j de DEHP sur les poids relatifs et absolus des testicules chez le rat mâle de 21JPN	47
Figure 8 : Effet d’une exposition <i>in utero</i> à 4mg/kg/j du DEHP sur le taux de la testostérone chez le rat mâle au 21JPN	47
Figure 9 : Spectre ATR de la poudre de PVC	60
Figure 10 : Zoom de la zone X du spectre ATR de la poudre de PVC	61
Figure 11 : Spectre ATR du DOP	62
Figure 12 : Spectre FTIR du PVC avec et sans DOP.....	63
Figure 13 : Zoom de la zone Y des spectres FTIR du PVC avec et sans DOP	63
Figure 14 : Spectres FTIR des bandes caractéristiques des films aux différentes concentrations du DOP	64
Figure 15 : Spectre UV du DOP dans l’éthanol	65
Figure 16 : Présentations graphiques de variation du % de migration du DOP des films aux différentes concentrations en DOP (1-15-30 %) dans l’éthanol 96° pendant 2h à 70°C 68	
Figure 17 : Présentations graphiques de variation de % de migration du DOP des films à 30 % DOP pendant 2h à 70°C dans l’Ethanol 96- Ethanol 50% et Eau distillée	71
Figure 18 : Variation du taux de migration en fonction de la température	74

Figure 19 : Variation de M_t/M_∞ du DOP en fonction \sqrt{t} dans l'éthanol 96° et éthanol 50% pendant 2h à 70°C	76
Figure 20 : Présentation graphique de la variation de % de migration du DOP des films à 15 et 30 %, et 1 % dans l'éthanol 96° pendant 2H à 70°C	79
Figure 22 : Spectres FTIR et ATR des films 1% DOP dans l'éthanol 96° à 70°C	80
Figure 23 : Zoom de la zone spectrale de groupement OH de l'éthanol, dans 1% DOP avant et après migration par FTIR	81
Figure 24 : Gonflement des films 1% DOP après le test de migration, 2H dans éthanol96° à 70°C	81
Figure 25 : Variation de la migration du DOP dans l'éthanol et éthanol 50 % pendant 2H à 70°C	82
Figure 26 : Présentation graphique des % de migration du DOP dans l'eau distillée pendant 2H à 70°C	83
Figure 27 : Spectres ATR d'un film 30% DOP avant et après migration dans l'eau	83
Figure 28 : Variation des taux de migration du DOP dans l'éthanol 96° à 4, 50 et 70 °C	84
Figure 29 : Variation de % du DOP migré mesuré par les deux techniques, spectroscopie UV et FTIR, dans les différentes conditions opératoires adoptées	87

Liste des tableaux

Tableau I : Principales propriétés des différents types de PVC	6
Tableau II : Identité des principaux phtalates	8
Tableau III : Classification règlementaire – explication	10
Tableau IV : Classification de certains phtalates en tant que CMR	11
Tableau V : Liste des simulants de denrées alimentaires.....	16
Tableau VI : Conditions de contact normalisées	17
Tableaux VII : Identification du DEHP	20
Tableau VIII : Propriétés physico-chimiques du DEHP	21
Tableau IX : Valeurs toxicologiques de référence connues pour le DEHP.....	24
Tableau X : Effets d’une exposition fœtale au DEHP sur les fonctions testiculaires néonatale de rat	34
Tableau XI : Récapitulatifs des résultats préliminaires	44
Tableau XII : Produits utilisés pour l’étude de migration	52
Tableau XIII : Solvants utilisés pour l’étude de migration	53
Tableau IVX : Simulants utilisés pour l’étude de migration	53
Tableau VX : Formulations réalisées	54
Tableau VIX : Conditions et essais de migration réalisés	54
Tableau VIIX : Coefficients de diffusion dans l’éthanol 96° et éthanol 50% à 70°C.....	76
Tableau VIIIX : Doses limites spécifiques du DOP dans les différents milieux à 70°C	77

Liste des abréviations

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

ANSES: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ATSDR : Agency for Toxic substances and Disease Registry

CAS (n°) : Chemical Abstract Services

CE : Commission Européenne

CE : Commission Européenne

CIRC: Centre International de Recherche sur le Cancer

CLP: Classification, Labelling and Packaging

CMR : Cancérogènes, Mutagènes et toxiques pour la Reproduction

CPSC : Consumer Product Safety Commission américaine

DEHP : Di-(2-ethylhexyl) phtalate

DJT : Dose Journalière Tolérable

ECB : European Chemicals Bureau

ECHA: European Chemicals Agency

ECPI: Conseil Européen des Plastifiants et Intermédiaires

EFSA: European food safety authority

EINECS: European Inventory of Existing Chemical Substances

INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

INSERM : Institut National de la santé et de la recherche médicale

IRTF: Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier.

ISO : International Standardisation Organization

LMG: Limite de Migration Globale.

LMS: Limite de Migration Spécifique

LOAEL: Lowest Observable Adverse Effect Level

MEHP: mono-ethylhexylphtalate

NOAEL: No Observable Adverse Effect Level

OCDE: Organisation de coopération et de développement économiques.

OFEV: Office fédéral de l'environnement

OFSP: Office fédéral de la santé publique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PC : Poids corporel

PVC : chlorure de polyvinyle

PVC: Polychlorure de Vinyle.

REACH: Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RSE: Réseau environnement santé

THF le tetrahydrofurane (ou 1,4-epoxybutane).

UE : Union Européenne

UV : Ultraviolet

SOMMAIRE

Introduction générale

Chapitre I : Généralités sur les emballages plastiques et législation

1.1.	Généralités sur les emballages plastiques	4
1.1.1.	Définitions	4
1.1.2.	Types de plastique	5
1.1.3.	Le polychlorure de vinyle (PVC)	5
1.1.4.	Plastifiants	6
1.1.4.1.	Phtalates	6
1.2.	Réglementation	9
1.2.1.	Règlement No. 10/2011	9
1.2.2.	Le règlement REACH	10
1.2.3.	Règlement (CE) N° 1272/2008 (CLP)	10
1.2.4.	Réglementation Algérienne, le décret exécutif n° 91-04	11

Chapitre II : Phénomène de migration

2.1.	Les interactions emballage/aliment	12
2.2.	Fondements sur la migration polymère/aliment	13
2.2.1.	Mécanisme de migration	13
2.2.2.	Types de migration	15
2.2.3.	Simulants de denrée alimentaires	15
2.2.4.	Conditions de contact	17
2.2.5.	Facteurs d'influence sur la migration	18

Chapitre III : Di (2-éthylhexyl) phtalate (DEHP)

3.1.	Identification de DEHP	20
3.2.	Propriétés physico-chimiques	21
3.3.	Production de DEHP	21
3.4.	Principaux usages intentionnels du DEHP	22
3.5.	Réglementation et limites de tolérance de DEHP	23
3.6.	Sources de contamination et voies d'exposition	25

3.6.1. Sources de contamination	25
3.6.2. Voies d'exposition chez l'homme	27
3.7. Niveaux d'exposition au DEHP	30
3.8. Toxicocinétique et métabolisme	31
3.9. Toxicité de DEHP sur l'organisme	32
3.9.1. Notion faible dose	32
3.9.2. Effets sur la santé humaine	33

Travail expérimental

A. Etude de la reprotoxicité à faible dose du DEHP chez le rat Wistar exposé *in utéro*

A. I) Matériels et méthodes	37
A.II.1. Résultats	44
A.II.2. Discussion	48

B. Etude de la migration de DEHP quelques simulants de denrées alimentaires.

B.I. Matériels et méthode	52
B.II. Résultats et Discussion	60
Conclusion générale et Perspectives	88

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Au cours des dernières décennies, les inquiétudes vis-à-vis des changements survenus dans l'environnement et de leurs conséquences possibles sur la fonction de reproduction masculine se sont amplifiées (**Delbes et al.**, 2006 ; **Slama et al.**, 2006). En effet, le déclin de la qualité du sperme humain a été observé par de nombreuses équipes scientifiques et dans de nombreuses régions du globe (**Nelson et Bunge**, 1974 ; **Carlsen et al.**, 1992 ; **Auger**, 1997; **Adamopoulos et al.**, 1996 ; **Irvine et al.**, 1996, **De Mouzon et al.**, 1996). La concentration de spermatozoïdes décline jusqu'à 50% ces cinquante dernières années (**Carlsen et al.**, 1992). Parallèlement, la fréquence des affections de l'appareil reproducteur mâle a augmenté dans l'espèce humaine (**Adami et al.**, 1994 ; **SEER**, 2003). **Toppari et al.**, ont rapporté en 2001 une augmentation de l'incidence de deux anomalies congénitales des organes génitaux externes : la cryptorchidie et l'hypospadias.

Mais qu'elle est l'origine ou la cause de toutes ces pathologies ?

Une des premières réponses par rapport à ce sujet a été apportée il y a déjà plus de cinquante ans par **Roy Hertz** qui, en 1958, estimait « *qu'il fallait prendre en considération le fait que l'utilisation d'hormones dans l'alimentation animale risquait d'exposer certains individus à ces hormones, alors qu'ils n'auraient jamais dû être en contact de leur vie avec de telles molécules. ..., que nous étions en train de créer un cycle des stéroïdes dans notre environnement, et que nous devons sérieusement prendre en considérations les implications que cela pouvait entraîner pour notre développement, notre croissance et peut-être pour nos fonctions de reproduction* ».

Quatre ans après, **Rachel Carson** écrit son livre "Silent Spring", qui provoque une prise de conscience du public des problèmes liés aux risques toxiques des polluants chimiques toxiques dans l'environnement.

De là est née l'hypothèse que des xénobiotiques relargués dans l'environnement, retrouvés dans l'alimentation, et capables de mimer ou d'interférer avec l'action des hormones endogènes, seraient responsables de ces troubles du développement, de la reproduction et du comportement observés dans les pays industrialisés et les zones polluées. Hypothèse amenée par **Theo COLBORN** qui donnera le nom de perturbateur endocrinien à ces molécules en 1991.

En 2008, **Rouiller-Fabre** et *al.*, ont constaté qu'un certain nombre d'arguments sont en faveur d'un effet délétère d'une famille particulière de perturbateurs endocriniens, *les phtalates*, sur la fonction de reproduction masculine. En 2006, **Latini** et *al.*, ont indiqué que le phtalate le plus important retrouvé dans l'environnement est le **Di-2(éthylhexyl) phtalate (DEHP)**.

Le DEHP est classé par les agences réglementaires, comme substance hautement préoccupante, toxique pour la reproduction catégorie 1B, sur la base des études toxicologiques à des doses supérieures à la NOAEL. Par ailleurs, **Rouiller-Fabre** et *al.*,(2008), ont indiqué que, des études récentes ont établi des corrélations entre le développement du testicule fœtal et la reprotoxicité des phtalates, aux concentrations environnementales (faibles doses).

Le professeur **FRED VOM SAAL**, Biologiste à l'université du Missouri, Colombia suggère que « *La dose ne fait jamais le poison pour les hormones qui ne suivent pas les règles classiques de la toxicologie. Le principe, dose-effet, est complètement erroné, il peut marcher pour les produits traditionnels mais pas pour les hormones, pour aucune hormone !* ». Pour **MICHAEL THUM**, représentant de la société américaine de cancer, « *les effets à faibles doses sont une réalité scientifique établit* ».

Selon **l'Office Fédérale de l'Environnement (OFEV)**, la source principale d'exposition aux phtalates est l'emballage alimentaire via le phénomène de migration.

Afin de réduire le risque pour la santé de consommateur, le **règlement n°10/2011** de la Commission Européenne "concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires" a établi des limites de migrations spécifiques « LMS » pour les phtalates, pour le DEHP la LMS est de 1,5 mg/kg d'aliment.

Néanmoins, le respect de telles faibles limites (LMS) et la détermination des ces substances n'est pas une chose aisée, la contrainte majeure réside dans la présence de ces molécules à l'état de traces dans les aliments qui constituent des matrices complexes. Ceci impose donc de disposer d'outils analytiques très performants hautement sensibles et sélectifs.

Les méthodes de références mises au point, sont les méthodes chromatographique, chromatographie en phase gazeuse (CG) et la chromatographie en phase liquide (HPLC), avec divers détecteurs, la chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse (CGMS), s'impose de plus en plus car lui seul peut assurer la confirmation de la présence de composé recherché (**Camel V** et **Rega B.** 2012). Cependant la mise en œuvre de ces

méthodes est fastidieuse, très onéreuse et sont des méthodes indisponibles, inaccessibles dans la majorité des cas.

La mise en place de nouveaux outils analytiques simples et moins onéreux en parallèle des méthodes de références reste un défi car ces méthodes doivent être au moins aussi performantes que les méthodes de référence avec une valeur ajoutée en terme de technicité et de fiabilité.

Ce travail a pour objectif d'identifier les effets d'une exposition *in utero* au DEHP, à de faible dose, proches de celles de l'environnement, sur le système de reproduction chez le rat Wistar et développer une méthodologie analytique simple et fiable pour le suivie de la migration de DEHP d'un film en pvc plastifié vers quelques simulants de denrées alimentaires.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Généralités sur les emballages plastiques et législation

I.1. Généralités sur les emballages plastiques

I.1.1) Définitions

- **Matières plastiques :** Les matériaux plastiques, ou matériaux polymères, sont des matériaux constitués de macromolécules obtenues par polymérisation à partir d'un ou plusieurs motifs unitaires (Gillet, 2008).
- **Emballage :** L'emballage est défini comme tout objet constitué de matériaux de toute nature, destiné à contenir et à protéger des marchandises données, allant des matières premières aux produits finis. Il permet leur manutention et leur acheminement du producteur au consommateur ou à l'utilisateur, et assure leur présentation (Marcel, 2002).

I.1.2) Le polychlorure de vinyle (PVC)

Le PVC est un polymère linéaire obtenu par polymérisation du monomère chlorure de vinyle

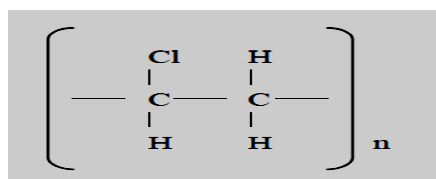


Figure 1 : Formule chimique générale du PVC (inertis 2006)

La production industrielle du PVC remonte au début des années 1930. C'est un plastique très présent dans notre vie quotidienne car l'ensemble de ses propriétés mécaniques et physiques et son aptitude à être modifié selon les besoins en font un matériau adapté à de multiples usages (Hruska et al., 2007).

Selon la commission Européenne (CE) (2005), le PVC est le 3ème polymère utilisé dans le monde après les polyéthylènes et les polypropylènes (20 % de la consommation mondiale totale des plastiques, soit de l'ordre de 28 millions de tonnes).

Inertis (2006) indique qu'il est utilisé dans de nombreux secteurs industriels grâce à ses caractéristiques (résistance, isolation, légèreté, imperméabilité, durabilité, résistance mécanique, etc.). Il représente 11% de marché des emballages plastiques en Europe (Mkacher, 2012).

On distingue, habituellement le PVC non plastifié, qu'on appelle PVC rigide et le PVC plastifié qui contient une grande quantité de plastifiant et qu'on appelle PVC souple.

Tableau I : Principales propriétés des différents types de PVC (Mark, 1999)

Propriétés	Unités	PVC rigide	PVC souple
Température de fusion	°C	160 à 170	140 à 170
Température de transition vitreuse	°C	75 à 105	- 40

I.1.2.1. Plastifiants

Les plastifiants sont des additifs utilisés en quantité élevée pour moduler les propriétés mécaniques des polymères, ces additifs présentent un risque très important de contamination des aliments emballés car ce sont de petites molécules extrêmement mobiles dans la matrice polymère et utilisées en quantité importante. Les phtalates sont les plastifiants les plus utilisés (Vitrac et Joly 2007).

I.1.2.1.1. Phtalates

Selon l'office fédéral de la santé publique (OFSP) (2013), les phtalates sont des plastifiants, ils rendent le plastique souple et flexible et sont utilisés dans de nombreux produits de la vie quotidienne, notamment les emballages.

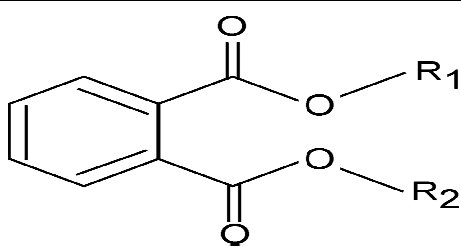
Le nom « phtalate » dérive du terme « acide phtalique » lui-même dérivant du mot « naphthalène ». Les phtalates ressemblent à l'huile végétale pure, ont peu d'odeur et confèrent des caractéristiques appréciables aux emballages: flexibilité, durabilité, longévité et coût peu élevé. Produits pour la première fois dans les années 1920, ils ont connu un essor très important dans les années 1950, lorsque le PVC est apparu (ineris, 2005).

Les phtalates ou esters phtaliques sont le produit d'estérification d'un acide phtalique avec un ou plusieurs alcools. Ils sont globalement caractérisés par une structure chimique incluant un cycle benzénique substitué en ortho par deux groupements carboxylates dont la taille des chaînes alkyles est variable. Selon l'alcool d'estérification, on distingue des esters phtaliques symétriques où les deux fonctions acides sont estérifiées par le même alcool (DEHP, DBP), dissymétriques où les deux fonctions acides sont estérifiées par des alcools différents (BBP), et non totalement définis lorsque les fonctions acides sont estérifiées par des alcools de type oxo (DINP, DIDP) (inserm, 2011).

Selon Conseil Européen des Plastifiants et Intermédiaires (**ECPI**) (2012), les phtalates se divisent en deux sous groupes :

- Les phtalates à longue chaîne moléculaire ou « phtalates longs », comme le DINP et le DIDP, constituent plus de 80% des phtalates utilisés en Europe. Ces molécules sont enregistrées par la réglementation européenne REACH et ne sont pas classifiées comme substances à risque pour la santé ou l'environnement.
- Les phtalates dits à courte chaîne moléculaire ou « phtalates courts », tels que le DBP, le BBP, le DIBP et le DEHP, sont reconnus comme « substances extrêmement préoccupantes » par la réglementation européenne des substances chimiques (REACH) en raison de leurs effets sur la reproduction observés dans le cadre d'études menées sur des animaux.

Tableau II : Identité des principaux phtalates (NICNAS, 2008 ; INSERM, 2011 ; ECPI, 2012)

R₁	R₂	Nom	PM (g.mol ⁻¹)	Exemples d'utilisation
Phtalates courts				
C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	Diéthyl-phtalate (DEP)	222,2	Cosmétiques, solvants, dispositifs médicaux ...
C ₈ H ₁₇	C ₈ H ₁₇	Di (2-éthyl-hexyl)- phtalate (DEHP)	390,6	Produits en PVC souple (récipients de nourriture, films plastiques pour l'emballage des aliments, tuyaux d'arrosage, poches de sang, cathéters, gants...), cosmétiques... etc.
C ₄ H ₉	C ₇ H ₇	Butylbenzyl-phtalate (BBP)	298,3	Cosmétiques, adhésifs et colles, produits automobiles, revêtements de sol en vinyle.
C ₄ H ₉	C ₄ H ₉	Dibutyl-phtalate (DBP)	278,3	PVC souple, les adhésifs, les encres d'imprimante, les cosmétiques et les insecticides...
Phtalates longs				
C ₉ H ₂₀	C ₉ H ₂₀	Diisononyl-phtalate (DINP)	418,6	Emballages alimentaires, câbles électriques, revêtements, industrie automobile, semelles
C ₁₀ H ₂₁	C ₁₀ H ₂₁	Diisodécyl-phtalate (DIDP)	447,0	Câbles électriques, revêtements, peintures, matériel médical
Formule chimique				

I.2. Réglementation sur les matériaux et les substances chimiques dans l'emballage plastique

I.2.1. Règlement N° 10/2011

Depuis le 1 avril de 2011, l'aptitude des matériaux à entrer en contact avec les aliments est régie par le règlement (EU) N° 10/2011 publié au Journal Officiel de la Commission Européenne le 14 janvier. (<http://www.contactalimentaire.com>).

Le règlement européen n°10/2011 de la Commission Européenne "concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires" établit "des exigences spécifiques applicables à la fabrication et à la commercialisation de matériaux et d'objets en matière plastique qui sont destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires, qui sont déjà en contact avec des denrées alimentaires ou dont on peut raisonnablement prévoir qu'ils entreront en contact avec des denrées alimentaires". Le texte couvre tous les plastiques mais aussi les multicouches et, sous certaines conditions, les multimatériaux. La liste des substances autorisées a été complétée pour constituer une liste exhaustive pour les monomères et les additifs (liste positive), et le statut de certains ingrédients, comme les substances d'aide à la polymérisation, les colorants, les solvants, les substances non intentionnellement ajoutées, a été clarifié. Un changement important intervient dans la prise en compte des additifs, des additifs analysés lorsqu'ils sont présents dans les produits finis mais également utilisés en production. Détaillés dans l'annexe III, les simulants de denrées alimentaires ont également évolué, tout comme les modalités des essais de conformité (annexe V). (industrie.com)

Le règlement CE n°10/2011 a fixé certaines restrictions d'utilisation et des LMS pour certains phtalate :

- Le BBP : Matériaux et objets réutilisables ; matériaux et objets à usage unique en contact avec des aliments non gras à l'exception des préparations pour nourrissons ; Auxiliaire technologique à des concentrations $\leq 0,1\%$ dans le produit final ; LMS = 30mg/kg simulant de denrée alimentaire),
- Le DEHP : Matériaux et objets réutilisables en contact avec des aliments non gras ; Auxiliaire technologique à des concentrations $\leq 0,1\%$ dans le produit final ; LMS = 1,5 mg/kg simulant de denrée alimentaire,

- Le DBP : Matériaux et objets réutilisables en contact avec des aliments non gras ; Auxiliaire technologique à des concentrations $\leq 0,05\%$ dans le produit final ; LMS = 0,3mg/kg).

1.2.5. Le règlement REACH

Le règlement européen n° 1907/2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH) (*Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals*) prévoit un régime d'autorisation spécifique pour les substances présentant un risque carcinogène, mutagène ou toxique pour la reproduction (CMR) de niveau 1 ou 2 selon la directive 67/548/CEE.

1.2.6. Règlement (CE) N° 1272/2008 (CLP)

La réglementation concernant le classement des substances chimiques est issue de la **directive 67/548/CEE**, remplacée depuis le 20 janvier 2009 par le **règlement (CE) n° 1272/2008**, appelé règlement **CLP** (**C**lassification, **L**abelling and **P**ackaging) relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges. Obligatoire à partir du 01/12/2010 pour les substances et du 01/06/2015 pour les mélanges.

Le présent règlement complète le système **REACH** pour l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques introduit en 2007.

La classification CMR (cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction) prévoit trois niveaux de risque par agent :

Tableau III : Classification réglementaire – explication

Classification des substances CMR par catégorie		
	Directive 67/548 CE	Règlement CLP
avéré pour l'homme	1	1A
Avéré pour l'animal et suspecté pour l'homme	2	1B
suspect-doute en l'absence d'informations sérieuses disponibles	3	2

Tableau IV : Classification de certains phtalates en tant que CMR (critères CLP)

Identification chimique internationale	Numéros CAS	Classification
dibutyl phthalate (DBP)	84-74-2	Repro. 1B
benzyl butyl phthalate (BBP)	85-68-7	Repro. 1B

Selon **Europa.eu** (2011), depuis février 2011, l'Europe a décidé d'interdire le DEHP, le DBP et le BBP d'ici 2014-2015. Ces substances chimiques seront interdites dans l'Union Européenne conformément à l'alerte REACH, sauf pour les entreprises ayant obtenu une autorisation individuelle d'utilisation ; ils devront prouver que les mesures de sécurité requises ont été prises pour contrôler efficacement les risques, ou que les avantages pour l'économie ou la société l'emportent sur les risques, et ce quelle que soit la quantité de substances.

1.2.7. Réglementation Algérienne, le décret exécutif n° 91-04

le décret exécutif n° 91-04 du 19 janvier 1991 relatif aux matériaux destinés à être mis en contact avec les denrées alimentaires et les produits de nettoyage de ces matériaux, est le seul règlement qui existe concernant les matériaux destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires , il précise dans l'article 05 que « les matériaux destinés à être mis en contact avec les denrées alimentaires doivent être élaborés exclusivement avec des constituants ne présentant aucun risque d'atteinte à la santé du consommateur »

Le mot « phtalates » ne figure pas dans la réglementation Algérienne , il ne fait pas encore l'objet d'une réglementation spécifique, mais on peut l'inclure dans l'article 07 de **la Loi n° 09-03** du 25 février 2009 relative à la protection du consommateur et à la répression des fraudes, qui stipule que « Les équipements, matériels, outillages, emballages et autres instruments destinés à être mis en contact avec les denrées alimentaires, doivent être composés exclusivement de matériaux ne pouvant pas altérer ces denrées.

Chapitre II

Phénomène de migration

II.1. Les interactions emballage/aliment

Un des rôles essentiels de l'emballage alimentaire est d'assurer une bonne protection du produit qu'il contient. Cependant, s'il évite les pollutions, les contaminations extérieures que pourraient subir les produits emballés ; s'il permet de contribuer au maintien de la qualité et de la sécurité, l'emballage est rarement inerte. 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 (Zaki, 2008). Bach Campa (2011) indique trois types d'interactions possibles entre l'emballage et l'aliment : la perméation, la sorption et la migration.

- **La perméation :** La perméation se caractérise par le transfert de gaz à travers l'emballage, notamment l'O₂ vers l'aliment, le CO₂ vers l'extérieur de l'emballage et le passage des composés volatils de l'extérieur vers l'aliment (Severin et al., 2011)
- **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).
- **La migration :** La migration des constituants de l'emballage (monomères résiduels, additifs, etc.) vers le produit conditionné est un autre type d'échange de matière qui constitue un problème de sécurité alimentaire (Bach Campa, 2011).

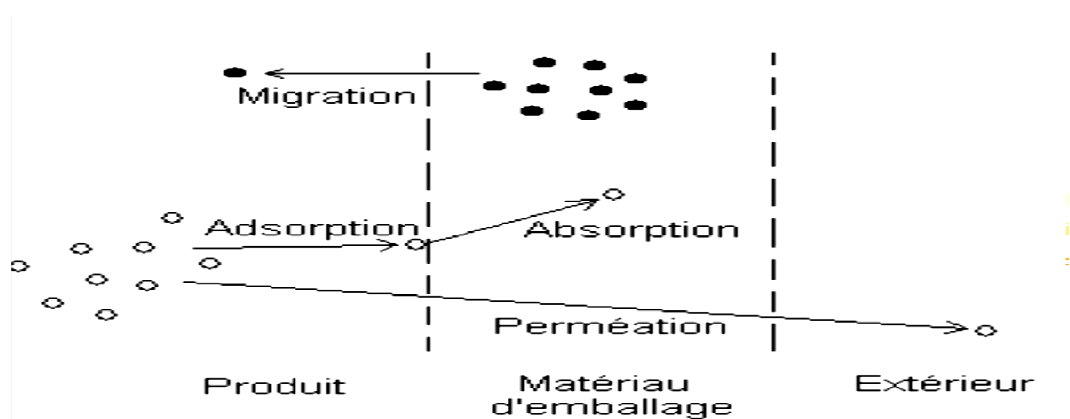


Figure 2: Schéma des différentes interactions possibles entre l'emballage, son contenu et le milieu extérieur.

II.2. Fondements sur la migration polymère/aliment

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).

II.2.1. Mécanisme de migration

Les additifs peuvent migrer du polymère vers l'aliment selon un processus purement physique. Ce processus conduit à une réduction de la durée de vie du matériau et à une pollution de l'aliment (**Bach Campa**, 2011).

La perte des additifs, d'après **Bach Campa** (2011), peut être décrite comme une séquence de deux actes élémentaires : la diffusion du cœur vers la surface et le passage des molécules à travers l'interface polymère/environnement.

Selon **Lau et Wong** (2000), le processus de migration de l'emballage polymérique vers le produit fini peut être décrit en trois étapes étroitement liées entre elles. Ces étapes selon les auteurs sont les suivantes :

II.2.1.1. Diffusion du migrant à travers le polymère

La diffusion, selon **Poulard** (1998), est un phénomène de transport moléculaire dont l'origine est l'existence d'un gradient de concentration. En effet, la diffusion tend à homogénéiser la répartition de l'additif dans le polymère, elle se fait des points de plus forte concentration vers les points de plus faible concentration.

La diffusion est plus rapide dans un matériau caoutchoutique et peu cristallin, qui présente une plus grande mobilité moléculaire, qui dépend principalement de la température, que dans un matériau vitreux et semi-cristallin (**Lau et Wong** 2000).

On considère en général, d'après **Fick** (1855), que la diffusion des molécules simples est Fickienne, c'est-à-dire que le flux de diffusion du pénétrant est proportionnel à son gradient de concentration.

Le coefficient de diffusion (D) représente la vitesse de migration d'une substance à travers chaque phase (**Lau et Wong** 2000). La migration des substances dans les systèmes polymère/aliment peut être modélisée par la loi de Fick suivant l'équation :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial C}{\partial x} \right)$$

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

II.2.1.2. Solvation dans l'interface polymère / aliment

Dans le cas où l'additif est en contact avec un liquide, la perte d'additif a lieu par extraction (**Bach Campa**, 2011).

Lors de l'extraction, on peut distinguer deux cas d'après **Fayolle** (2005) (Figure 3) :

- Le liquide ne pénètre pas ou peu dans le matériau : c'est seulement sa capacité à dissoudre l'additif (bon ou mauvais solvant) à la surface du polymère qui détermine la vitesse d'extraction. La perte d'additif dans le liquide est contrôlée par sa vitesse de diffusion dans le liquide.
- Le liquide pénètre profondément dans le matériau. Il va alors accélérer la diffusion de l'additif en plastifiant le polymère.

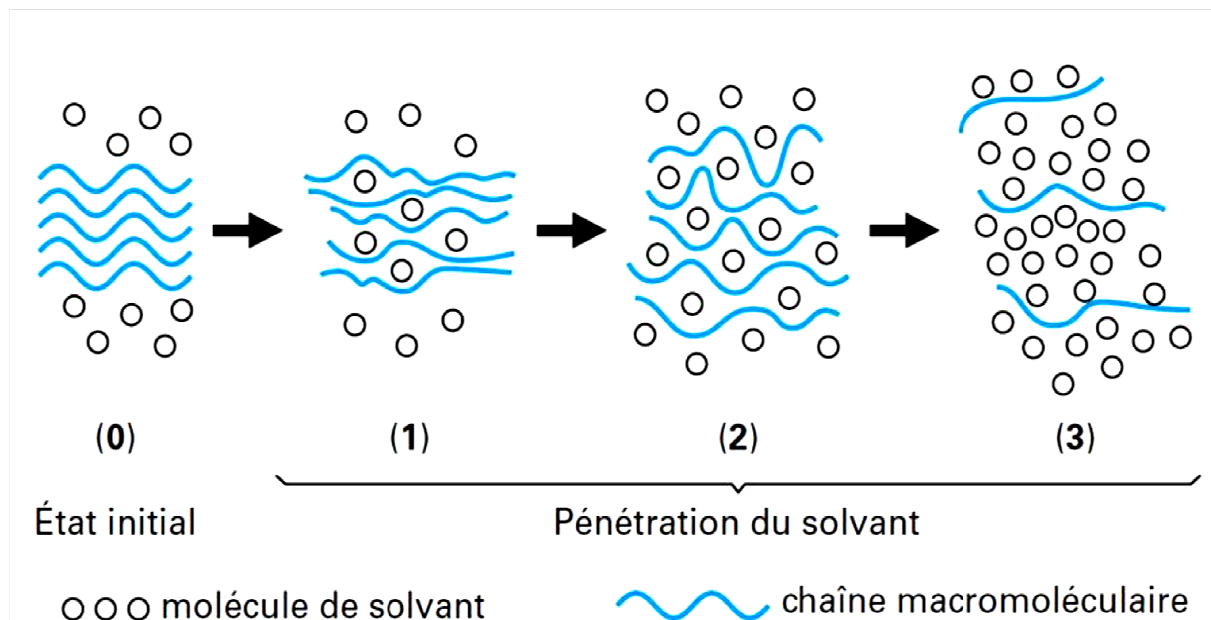


Figure 3 : Schématisation de la plastification des polymères (Fayolle, 2005)

II.2.1.3. 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.

II.2.2. Types de migration

Le **règlement n° 10/2011**, envisage deux notions de migrations :

- **La migration globale**, qui n'évalue que la masse globale de migrants perdus par l'emballage, sans distinguer la nature et la spécificité de ces migrants. La «limite de migration globale» (**LMG**), est la quantité maximale autorisée de substances non volatiles cédées par un matériau ou objet aux simulants de denrées alimentaires;
- **Les migrants spécifiques** qui, au contraire, s'efforcent de qualifier et d'identifier chacun de ces éléments. La «limite de migration spécifique» (**LMS**), la quantité maximale autorisée d'une substance donnée cédée par un matériau ou objet aux denrées alimentaires ou aux simulants de denrées alimentaires;

Le **règlement n° 10/2011**, indique que, la fixation des limites de migration repose sur l'hypothèse conventionnelle selon laquelle 1 kg de denrées alimentaires est consommé quotidiennement par une personne de 60 kg et les denrées sont emballées dans un récipient cubique d'une surface de 6 dm² cédant la substance.

Cette limite est liée à la dose journalière tolérable (DJT) calculée selon la relation:

$LMS \text{ (mg/kg aliment)} = 60 \times DJT \text{ (mg/kg poids corporel/jour)}$ ou $LMS \text{ (mg/kg)} = 6 \times LMS \text{ (mg/dm}^2\text{)}$ ou $LMS \text{ (mg/dm}^2\text{)} = 10 DJT$.

II.2.3. Simulants de denrée alimentaires

La mesure de la migration spécifique, en particulier avec un aliment donné, est une approche qui a été remise en question par plusieurs auteurs à cause des difficultés des procédures d'analyses. Pour y pallier, plusieurs liquides simulateurs d'aliments ont été utilisés pour étudier le phénomène (**Bach Campa**, 2011).

- **Définition**

«**Simulant de denrée alimentaire**», est un milieu d'essai qui imite une denrée alimentaire et qui, par son comportement, reproduit la migration à partir des matériaux destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires; (**règlement**, 2011)

Tableau V : Liste des simulants de denrées alimentaires

Simulant de denrée alimentaire	Abréviation
Ethanol à 10 % (v/v)	Simulant A
Acide acétique à 3% (m/v)	Simulant B
Ethanol à 20%	Simulant C
Ethanol à 50 %	Simulant D1
Huile végétale ou Ethanol absolu	Simulant D2
Oxyde de poly(2,6-diphényl-p-phénylène)	Simulant E

II.2.3.1. Affectation générale des simulants aux denrées alimentaires

Les simulants A, B et C sont affectés aux denrées alimentaires à caractère hydrophile qui peuvent extraire des substances hydrophiles. Le simulant B est utilisé pour les denrées alimentaires dont le pH est inférieur à 4,5. Le simulant C est utilisé pour les denrées alimentaires alcooliques ayant une teneur en alcool de 20 % maximum et les denrées alimentaires contenant une quantité significative d'ingrédients organiques qui les rendent davantage lipophiles.

Les simulants D1 et D2 sont affectés aux denrées alimentaires à caractère lipophile qui peuvent extraire des substances lipophiles. Le simulant D1 est utilisé pour les denrées alimentaires alcooliques ayant une teneur en alcool supérieure à 20 % et pour l'huile dans les émulsions aqueuses. Le simulant D2 est utilisé pour les denrées alimentaires contenant des matières grasses libres en surface.

Le simulant E est affecté aux essais de migration spécifique dans des denrées alimentaires sèches.

II.2.3.2. Conditions de contact (règlement n° 10/2011)

La migration est déterminée sur le matériau ou l'objet ou, si cela n'est pas possible, sur un échantillon prélevé sur le matériau ou l'objet ou un échantillon représentatif du matériau ou de l'objet. Un nouvel échantillon d'essai est utilisé pour chaque simulant ou type de denrées alimentaires. Seules les parties de l'échantillon destinées à entrer en contact avec les denrées alimentaires dans l'utilisation réelle sont mises en contact avec le simulant ou la denrée alimentaire.

L'échantillon est mis en contact avec le simulant de manière à reproduire les pires conditions d'emploi prévisibles quant à la durée de contact et à la température de contact.

Pour les durées de contact supérieures à 30 jours à température ambiante ou à une température inférieure, l'échantillon est testé lors d'un essai accéléré à température élevée pendant maximum 10 jours à 60 °C.

Les conditions de contact normalisées sont résumées dans le tableau VI ;

Tableau VI : Conditions de contact normalisées

Durée de contact en jour (j) ou heure (h)	Conditions de contact prévues
2 h à 70 °C	Toute condition comprenant le chauffage à 70 °C au maximum pendant 2 heures au maximum ou le chauffage à 100 °C au maximum pendant 15 minutes au maximum, non suivie d'un entreposage de longue durée à température ambiante ou à l'état réfrigéré.
10 j à 50 °C	L'essai pendant 10 jours à 50 °C couvre toutes les durées d'entreposage à l'état réfrigéré et congelé, y compris le chauffage à 70 °C au maximum pendant 2 heures au maximum ou le chauffage à 100 °C au maximum pendant 15 minutes au maximum et les durées d'entreposage de maximum six mois à température ambiante.
10j à 4°C	L'essai pendant 10 jours à 4°C couvre les durées d'entreposage inférieures à 30 jours à l'état réfrigéré.

II.2.4. 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) 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 (**Bach Campa**, 2011).

- **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 (**Zaki**, 2008 et **Bach Campa**, 2011)

- **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 le PVC plastifié, est plus rapide que pour les polymères à l'état vitreux et semi-cristallin (PET, PVC, PA). (**Pennarun**, 2001; **afssa**, 2006).

- **Le milieu au contact**

Le caractère lipophile ou hydrophile du migrant va déterminer sa capacité à diffuser vers l'aliment. Les monomères, stabilisants et les additifs sont habituellement des molécules lipophiles. Même si leur diffusion est possible dans les aliments aqueux, ils migrent davantage dans les aliments gras (**Feigenbaum et al.**, 1993).

- **Le conditionnement**

Il est généralement admis que toute étape impliquant un séjour à haute température au cours du conditionnement, du stockage et de la préparation finale de l'aliment emballé augmente le risque de migration (**Vitrac et Joly**, 2007).

- **La surface de contact**

Il existe une relation proportionnelle entre la quantité de DEHP relarguée et la surface de contact entre l'emballage et l'aliment (**Feigenbaum** et *al.*, 1993).

- **Le temps de contact**

La quantité de DEHP relarguée augmente avec le temps de contact entre le contenant et le contenu jusqu'à épuisement de la quantité de phtalate dans le matériau. Cependant le taux de plastifiant migrant n'évolue pas de façon linéaire dans le temps, généralement le relargage est très important pendant les 24 premières heures puis s'atténue (**Zaki**, 2008).

- **La température**

L'augmentation de la température favorise la migration en augmentant la mobilité moléculaire du polymère, d'après **Zaki** (2008), la vitesse de diffusion est fonction de la température.

Chapitre III

Di (2-éthylhexyl) phtalate (DEHP)

Très apprécié pour les propriétés mécaniques qu'il confère au PVC et pour la facilité de sa transformation, il présente un très bon rapport qualité prix, le DEHP est considéré depuis plus d'une trentaine d'années comme le produit standard du marché des plastifiants (ECPI, 2012).

Le DEHP connu aussi sous le nom de dioctylphtalate (DOP), est un ester ramifié de la famille des phtalates. Il a pour formule chimique $C_{24}H_{38}O_4$ et pour numéro CAS 117-81-7 (ineris, 2005).

III.1. Propriétés physico-chimiques

Les principales propriétés physico-chimiques du DEHP sont résumées dans le tableau suivant ;

Tableau VII : Propriétés physico-chimiques du DEHP (CIRC monographie 2012)

Forme physique	Liquide huileux très peu volatil, incolore, odeur très faible.
Poids moléculaire ($g \cdot mol^{-1}$)	390,57
Point d'ébullition ($^{\circ}C$)	384
Point de fusion ($^{\circ}C$)	-55
Pression de vapeur (mm Hg à 25 $^{\circ}C$)	1.42×10^{-7}
Densité (g/cm^3 à 25 $^{\circ}C$)	0,981
Solubilité	Peu soluble dans l'eau (0,27mg/l à 25 $^{\circ}C$), soluble dans les solvants organiques et dans le sang.
Point d'ébullition ($^{\circ}C$)	384

III.2. Production de DEHP

Selon l'inrs (2013), le DEHP a eu ces 50 dernières années une importance économique considérable au regard des quantités produites. La production mondiale a atteint 2 millions de tonnes (t) en 2002 puis sa consommation a diminué notablement dans l'union européenne. Ainsi de 595 000 t produite en 1997 cette quantité est passée à 340 000 t en 2007 et serait inférieure à 100000 t actuellement. Néanmoins le DEHP fait encore partie de l'environnement quotidien il peut se retrouver dans de nombreuses formulations industrielles et domestiques.

III.3. Principaux usages intentionnels du DEHP

L'ineris a identifié en 2010, trois (3) principales applications du DEHP en Europe :

- Plastifiant du PVC (~95%) : Plus de 95 % du DEHP consommé est employé comme plastifiant dans l'industrie des polymères, et plus particulièrement dans la production de produits en PVC souple (emballages alimentaires, fil électrique, revêtement de sol, isolation), appareils médicaux, jouets et cuirs synthétiques ;
- Plastifiant de polymère non-PVC (résines vinyliques, esters cellulosiques, caoutchoucs) (~2%) : agent anti-mousseux dans la production de papier, émulsifiant pour cosmétique, parfums et pesticides ;
- Usage Non-polymère (~3%) : peintures, encre et enduits d'étanchéité.

Plusieurs auteurs rapportent l'utilisation de DEHP comme plastifiant dans :

- Le polyéthylène téréphtalate (PET), (**Casajuana et Lacorte, 2003; Biscardi et al., 2003 Fankhauser-Noti et Grob, 2006; Montuori et al., 2008 ; Marie-Hélène, 2013**). En effet les auteurs ont signalé la présence quasisystématique de DEHP dans les eaux embouteillée en PET à des concentrations très variables suivant les études (**Biscardi et al., 2003 ; Dargnat, 2008 ; Senthil et Ligy, 2009 ; Bach Campa, 2011 ; Marie-Hélène, 2013**).
- Le polyuréthane le substitut de PVC pour les produits pharmaceutiques (**Bergé, 2012**).

III.4. Réglementation et limites de tolérance de DEHP

III.4.1. Classification réglementaire (inrs 2010)

Mutagène	-UE : non classé
Cancérogène	-UE : non classé -IARC : groupe 3 , l'agent est inclassable quant a sa cancérogénicité pour l'Homme (2000) -EPA : groupe B2 , l'agent est supposé cancérogène pour l'Homme (1988)
Toxique pour la reproduction	- Directive 67/548 CE: cat 2 : substance devant être assimilées à des substances altérant la fertilité humaine (phrase de risque R60 : peut altérer la fertilité) et substance devant être assimilées à des substances causant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine (phrase de risque R61 : risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant) (1996) - CLP : Cat 1B : Substances présumées toxiques pour la reproduction humaine (phrase de risque H360FD : peut nuire à la fertilité peut nuire au fœtus (2008).

Pictogramme selon le règlement CLP



III.4.2. Valeurs toxicologiques de référence

Les évaluations de risque effectuées par l'EFSA ont abouti à une dose journalière tolérable (DJT) de **50 µg/kg pc/j** (efsa, 2005).

En 2010, la *Consumer Product Safety Commission* américaine (CPSC) déterminait une DJT de **5,8 µg/kg pc/j**.

Le tableau suivant résume les valeurs toxicologiques de référence de trois agences gouvernementales pour les principaux phtalates.

- **NOAEL**, *no observable adverse effect level*
- **LOAEL**, *lowest observable adverse effect level*

Tableau IX: Valeurs toxicologiques de référence connues pour le DEHP (OMS, EFSA, CPSC).

Valeurs toxicologiques de référence de DEHP			
	OMS 2003	EFSA 2005	CPSC 2010
NOAEL (mg/kg/j)	2,5	5	5,8 (LOAEL)
Facteur de sécurité	100	100	1000
DJT (µg/kg pc/j)	25	50	5,8
Espèce	Rat	Rat	Rat
Étude de référence		Wolfe et Layton, 2003	David et al., 2000

III.4.3. Limites de tolérance dans les emballages alimentaires

Le règlement **CE n°10/2011** a interdit le DEHP dans les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires grasses et fixe une LMS de 1,5 mg/kg simulant de denrée alimentaire pour le contact avec les aliments non gras, avec utilisation comme auxiliaire technologique à des concentrations $\leq 0,1\%$.

Le DEHP a été inscrit sur la liste des substances prioritaires à entrer sur la « liste des candidats » pour l'autorisation sous REACH, publiée le 28 octobre 2008 par l'ECHA (Bergé, 2012).

III.5. Sources de contamination et voies d'exposition

III.5.1. Sources de contamination

III.5.1.1. Contamination de l'environnement

Selon L'OFSP, les phtalates sont utilisés dans de nombreux domaines et sont donc omniprésents dans l'environnement. Ils ne sont pas liés chimiquement aux matières plastiques, ils sont dispersés dans la masse du produit et sont donc relativement diffusibles dans le proche environnement. Leur dispersion peut survenir à différents stades : fabrication, transport, utilisation et enfin, lors de la dégradation et/ou du recyclage des produits finis.

Les principales voies d'apport des phtalates à l'environnement selon l'office fédéral de l'environnement (OFEV) sont :

- Les émissions dans l'air (volatilisation), dégradation des produits en PVC au niveau d'industries, ou autre, en contenant dans leur composition ;
- les pertes par lessivage et/ou solubilisation (ruissellement sur les toitures et les chaussées lors des phénomènes pluvieux, nettoyage de véhicules, de surfaces intérieures, etc), ils se retrouvent ensuite dans les eaux, les sols et les sédiments.

En générale, d'après INRS (2013), les sources de contamination environnementale peuvent être ponctuelles ou diffuses.

- **Sources ponctuelles** : sont les émissions lors de la production de phtalates, lors de la production de PVC et de polymères ainsi que lors des usages industriels du PVC. Elles représentent de 5 à 10 % des rejets à l'environnement.
- **Sources diffuses** : sont beaucoup plus importantes (90 à 95 %) et comprennent les émissions de phtalates lors de l'utilisation de produits finis ainsi que la dégradation de déchets (incinération, décharges, démantèlement de véhicules).

III.5.1.2. Contamination de l'être humain

Les sources de contamination pour l'être humain, selon OFSP en 2012, sont diverses, les principales sont :

- Alimentation, matériaux d'emballage, eau potable et objets usuels (Gants en PVC, ustensiles, récipients, tuyaux, jouets ...).
- Air ambiant intérieur ou l'environnement intérieur (dégagement de gaz par les revêtements de sols et les meubles revêtus de matière plastique)

- L'environnement extérieur (eau, air, sol)
- Les dispositifs médicaux
- les produits cosmétiques

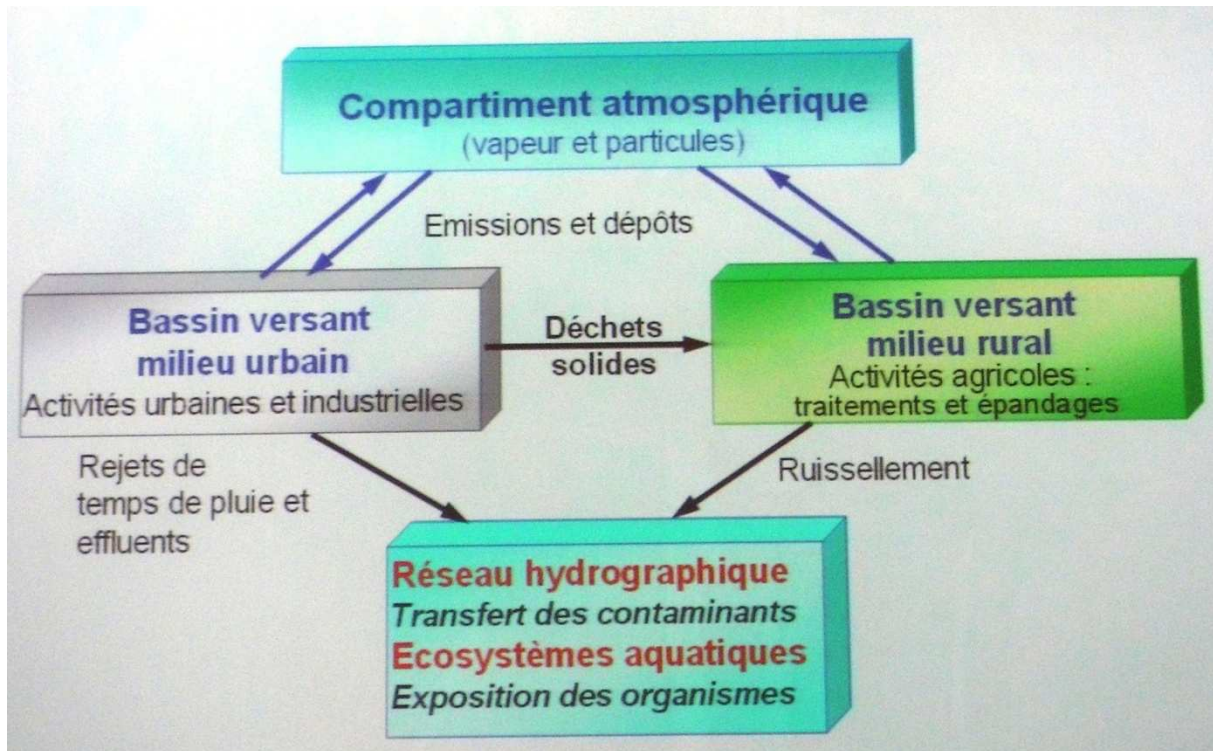


Figure 4 : Diffusion des phtalates dans l'environnement (RES 2013).

III.5.2. Voies d'exposition chez l'homme

L'exposition humaine aux phtalates peut se faire par :

- Voie orale
- Voie respiratoire
- Voie cutanée
- Voie parentérale
- Voie transplacentaire

- **Voie orale (ingestion)**

L'emballage alimentaire est la principale source d'exposition humaine aux phtalates, d'après **INSERM** (2011).

L'ingestion d'aliments contenant des phtalates ayant librement diffusé à partir des matériaux d'emballages ou lors de leur manipulation serait la principale source d'exposition humaine (**Dargnat** 2008, **Muczynski** 2011)

En raison de leur solubilité dans les corps gras, les phtalates ont tendance à se concentrer dans les aliments les plus gras tels que le beurre, le lait ou le fromage, mais aussi dans la viande (**Dargnat** 2008).

Plusieurs études ont montré la présence des phtalates dans divers produits alimentaires ainsi que dans l'eau de bouteille suite à leur migration à partir d'emballages, les chercheurs ont mis en évidence la pénétration de DEHP dans les denrées alimentaires durant leur transformation, leur conditionnement et leur stockage.

Cependant, une étude récente de **Sathyanaarayana** de l'Université de Washington, publiée le 27 février 2013, révèle que même les aliments biologiques ou préparés artisanalement, cuits et conservés dans des contenants sans plastique peuvent être contaminés aux phtalates tout simplement parce que l'ensemble de la chaîne alimentaire est contaminée. Les chercheurs ont mesuré les concentrations de DEHP dans différents aliments ; Les produits laitiers dont le beurre, la crème, le lait et le fromage, avaient des concentrations de plus de 440 nanogrammes / gramme, la cannelle et le poivre supérieures à 700 ng / g, la coriandre 21.400 ng / g.

Les enfants peuvent ingérer des phtalates en consommant de la nourriture contaminée et en suçant des objets en PVC (**Ricard**, 2011). En effet, d'après **Almeras** et *al.*, (2010), les

jouets constituaient une source d'exposition importante pour les enfants notamment du fait qu'ils ont tendance à les porter à la bouche pour les mâcher, les sucer voire en avalant de petits morceaux.

- **Voie respiratoire (Inhalation)**

Selon **Muczynski** (2011), l'inhalation de particules contaminées contenant des phtalates constitue le deuxième mode d'exposition notable.

Les phtalates sont omniprésents dans l'air ambiant en raison de leur ubiquité dans les matériaux et les produits industriels. Cependant, des aérosols à forte teneur peuvent être émis au voisinage des postes de travail où les phtalates se trouvent utilisés à chaud et sous pression. Ceci survient fréquemment lors de leur mise en œuvre industrielle (fabrication de films, d'articles finis), et représente généralement la source majeure de l'exposition professionnelle et d'émission dans l'air intérieur et extérieur. Cette dernière peut atteindre de 1 à 10 mg.m⁻³ en 8 heures pour les postes les plus exposés. (**Dargnat** 2008)

Le consommateur est également exposé de manière journalière à de faibles concentrations par inhalation d'aérosols issus des cosmétiques (parfums, déodorants), des produits ménagers, des colles ou des revêtements intérieurs. (**Dargnat**, 2008)

- **Voie cutanée**

Le contact cutané avec les phtalates purs peut se produire pour les ouvriers pendant la fabrication industrielle. (**Dargnat**, 2008)

Selon **Ricard** (2011), l'absorption dermique de DEHP, en raison de l'application de produits de soins tels que les crèmes solaires, shampoings, déodorants, lotions, et autres cosmétiques, peut être considérée comme une voie importante d'exposition particulièrement pour les enfants. D'après l'étude de **Wormuth** (2006), plus de 80% de l'exposition au DEHP est due à l'application dermique de produits de soins (parfums, crèmes pour la peau, déodorants) chez les enfants comme chez les adultes.

- **Voie parentérale (Contamination médicale)**

Pour les personnes hospitalisées, d'après **Ricard** (2011), la transmission directe dans la circulation sanguine par les tubulures intraveineuses est la voie d'exposition majeure aux phtalates.

Selon la commission européenne (2008), le DEHP est le premier plastifiant utilisé dans les dispositifs médicaux en PVC comme les conteneurs pour le sang ou les nutriments, les tubes et les cathéters.

Une autre source potentielle d'exposition, selon **Hauser et al.**, 2004, serait les capsules enveloppant les médicaments. En effet, les médicaments nécessitant une absorption spécifique au niveau de l'intestin sont entourés d'une capsule de polymères pouvant contenir des phtalates et plus particulièrement du DEHP.

Un taux élevé de DEHP ayant été dosé dans les poches de sang médicales, la transfusion sanguine peut dès lors, constituer une forte source ponctuelle de contamination **Wormuth** (2006).

- **Voie transplacentaire**

Il existe une transmission de l'exposition maternelle au fœtus par le cordon ombilical. Le DEHP traverse la barrière placentaire (**Sathyanarayana**, 2008).

Les sources et voies d'exposition environnementales aux phtalates sont résumées dans la figure 4

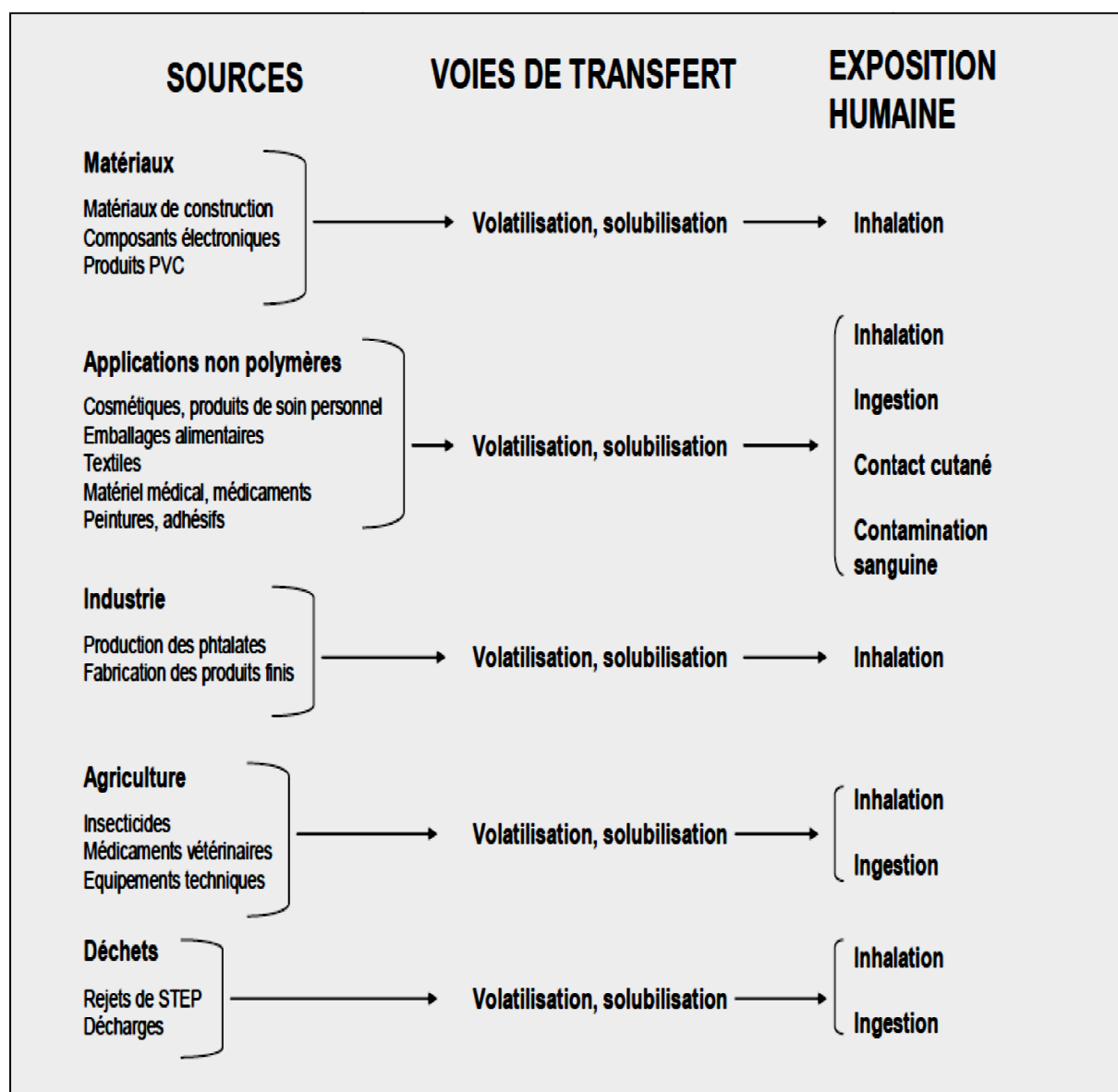


Figure 4 : Sources et voies d'exposition environnementales aux phtalates (Dargnat, 2008)

III.6. Niveaux d'exposition au DEHP

III.6.1. Exposition en population générale

L'exposition chez l'adulte au DEHP est estimée en moyenne à environ 2 à 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ de poids corporel par jour d'après les données de concentrations urinaires en DEHP ou de ses métabolites dans les populations occidentales (inserm, 2011)

Une récente étude Allemande de **Heinemeyer** et *al.*, en 2013, a estimé une exposition moyenne au DEHP via l'alimentation de 3,9 à 9,3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$.

III.6.2. Exposition des enfants, nourrissons et nouveau-nés

Wittassek et al., (2007b) ont estimé les niveaux médians d'exposition au DEHP entre 4,3 et 7,8 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ chez les enfants âgés de 2 à 14 ans. En 2005, l'**EFSA** estimait que l'exposition au DEHP d'enfants de plus de 6 mois consommant des aliments pour bébés prêts à l'emploi était, dans les cas les plus défavorables, de 23,5 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$.

III.6.3. Exposition *in utero*

Dans sa thèse de doctorat en 2011, **Ricard** indique que l'exposition fœtale a été démontrée dans plusieurs études, elle est corrélée à l'exposition de la mère. Dans leur étude, **Wittassek et al.**, (2009) ont mesuré les concentrations de métabolites des principaux phtalates dans le liquide amniotique récupéré au cours de 11 naissances par césarienne. Le niveau de MEHP a été estimé en moyenne de 1,6 $\mu\text{g}/\text{l}$.

III.7. Toxicocinétique et métabolisme

- **Toxicocinétique**

Le DEHP pénètre dans l'organisme essentiellement par orale (pour plus de 75 %) mais aussi faiblement par voie cutanée (pour 2 à 5 %) ; l'absorption digestive est rapide et importante de l'ordre de 50 à 75 % (**inrs** 2013).

Le DEHP se distribue dans le foie, le rein, les testicules et le sang (**inserm**, 2011 ; **anses** 2012 ; **inrs** 2013). Des résidus de DEHP ont été détectés dans le foie des fœtus de rats dont la mère avait été traitée par gavage durant la gestation, démontrant la capacité du DEHP à traverser la barrière placentaire (**Srivastava et al.**, 1989 ; **Stroheker et al.**, 2006).

- **Métabolisme**

Le métabolisme du DEHP aboutit à la formation d'une vingtaine de métabolites. Le DEHP est d'abord hydrolysé par des lipases avec formation du mono (2-éthylhexylphtalate) (MEHP), métabolite majoritaire dans le sang, et du 2-éthylhexanol, lui-même étant rapidement hydrolysé en acide 2-éthylhexanoïque. Puis le MEHP est oxydé en différents métabolites et dans une moindre mesure hydrolysé en acide phtalique (**ATSDR**, 2002).

Selon l'**ECB**, (2008), les dérivés monoesters sont souvent plus toxiques que le phtalate de départ, c'est en particulier le cas du MEHP, plus toxique que le DEHP dont il est issu.

Latini a indiqué en 2005, que les métabolites secondaires du DEHP sont jusqu'à 100 fois plus toxiques que le MEHP.

- **Demi-vie**

Sous sa forme libre, le DEHP a une demi-vie sanguine courte de l'ordre de 28 minutes ; le MEHP a une demi-vie sanguine supérieure à 3 heures (INRS 2013).

- **Elimination**

Les métabolites sont éliminés pour une grande partie dans les urines, Une étude sur volontaire a montré que 74,2 % de la dose de DEHP ingérée sont éliminés dans les urines (INRS 2013).

Une excrétion dans le lait maternel et une distribution placentaire (détection dans les tissus foetaux) ont également été rapportées (ANSES 2012).

En fin, le rapport d'expertise « reproduction et développement » de l'INSERM en 2011 indique que même si on n'observe pas de bioaccumulation, il est important de signaler que l'exposition est continue du fait de la diversité des sources de contamination.

III.8. Toxicité de DEHP sur l'organisme

III.8.1. Notion faibles doses

Selon EFSA (2012) et ANSES (2013), durant la dernière décennie un nombre croissant d'études se penchent sur les effets des substances chimiques à faibles doses, et notamment les « perturbateurs endocriniens ». Selon l'hypothèse de la faible dose, il est possible que ces substances entraînent des effets indésirables à faibles doses, mais pas nécessairement à certaines doses plus élevées. Elles ne suivent donc pas la courbe dose-réponse classique, selon laquelle les effets indésirables sont plus probables lorsque les doses sont plus élevées. Au contraire, elles peuvent suivre un autre type de courbe dose-réponse, une courbe en forme de U avec des effets observés à des doses faibles ou élevées, mais pas à des doses intermédiaires. Une telle courbe dose-réponse est désignée par l'expression « courbe dose-réponse non monotone ». Ces observations remettent en question les concepts actuels de l'évaluation des risques associés aux produits chimiques.

- **Définition**

Le terme « faibles doses » peut se définir en deux notions selon UNEP et OMS (2012) :

- 1) Doses inférieures aux NOAEL, LOAEL ;
- 2) Doses réelles auxquelles l'Homme est exposé quotidiennement dans son environnement ;

- **Impact de la fenêtre d'exposition**

Ce n'est pas la dose qui fait le poison mais c'est la période d'exposition !

Les périodes d'exposition les plus sensibles sont les expositions lors de la vie intra-utérine (INSERM, 2011), d'après Sharpe, (2006) les effets toxiques de DEHP observés chez l'adulte prendraient leur origine dans une perturbation du développement et des fonctions testiculaire durant la vie fœtale (hypothèse d'origine fœtale des maladies de l'adulte). Cette origine fœtale des effets toxiques de DEHP observé chez l'adulte s'appuie sur le fait que les deux grandes fonctions du testicule, la gamétogenèse et la stéroïdogénèse, prennent place au cours de la vie fœtale (Swan, 2011).

III.8.2. Effets sur la santé humaine

III.8.2.1. Effets perturbateur endocrinien (effets sur la fonction de reproduction)

Le DEHP est reconnu pour être un perturbateur endocrinien par les différentes autorités mondiales (OMS, 2012 ; EFSA, 2013 ; OFEV, 2013).

- **Définition d'un perturbateur endocrinien**

« Substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant de ce fait des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou au niveau des (sous-)populations ». (ANSES, 2013 et EFSA 2013).

- **Définition du système endocrinien**

« Système complexe composé de nombreux organes : pancréas, surrénales, testicules, ovaires, thyroïde et parathyroïdes sécrètent des hormones diffusées dans l'organisme par le sang ». Son fonctionnement est indispensable au maintien de la vie.

L'appareil reproducteur en faisant partie, son fonctionnement peut être altéré si le système endocrinien est défectueux. (INRS)

Le DEHP est surtout étudié pour sa toxicité sur la fonction de reproduction mâle et le développement de cette fonction au cours de la grossesse. Ce point est celui qui suscite le plus de débat et d'effervescence, soulevant un problème majeur de santé publique en raison du large champ d'utilisation de cette molécule.

Le DEHP, qui est classé comme toxique pour la fonction de reproduction, est également incriminé en tant que perturbateur endocrinien chez le rat, de par l'altération de la synthèse des stéroïdes qu'il entraîne (**Munczynski**, 2011).

D'après **INRS 2012**, « la toxicité pour la reproduction » se traduit par des effets néfastes sur la fonction sexuelle et la fertilité des hommes et des femmes adultes, ainsi que par des effets indésirables sur le développement de leurs descendants.

Les effets observables à la naissance après exposition au DEHP pendant la vie fœtale sont représentés dans le tableau VII ; les différents effets sont regroupés en deux catégories: Insuffisance fœtale en androgènes (altération de la fonction stéroïdogene) ou altération du développement des cellules germinales (altération de la fonction gamétogene). D'après **Saillenfait et al.** (2009 et 2010.)

Tableau X: Effets d'une exposition fœtale au DEHP sur les fonctions testiculaires néonatale de rat.

Effets de DEHP sur les fonctions testiculaires		
espèce	FONCTION STEROIDOGENE	FONCTION GAMETOGENE
rat	<ul style="list-style-type: none"> - Cryptorchidie - Hypospadias - Réduction de la Distance Ano-Génitale (DAG) - Retard d'acquisition de la puberté - Rétention des aréoles et des tétons - Diminution de la testostérone 	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution du poids et de la taille des testicules - Diminution de la quantité et de la qualité spermatique - Baisse de la fertilité - Pas de cancer testiculaire

III.8.2.2. Toxicité aiguë

Chez l'Homme et l'animal, il n'y a pas de toxicité aiguë observée par ingestion de DEHP, (par voie orale : DL50 : 20 000 mg/kg, et par inhalation : CL50 : 10 600 mg/m³ pendant 4h chez le rat) (ECB, 2008).

III.8.2.3. Toxicité subchronique et chronique autre que reprotoxique

D'après ANSES (2012), chez l'animal, les organes cibles affectés par une exposition orale au DEHP sont principalement le foie, les reins, et dans une moindre mesure le système nerveux.

Munczynski, (2011) indique que le foie est le premier organe cible identifié de l'effet délétère des phtalates. Selon l'auteur l'effet le plus évident d'une contamination chronique au DEHP par voie orale se traduit par une hépatomégalie prononcée. Au niveau fœtal, l'exposition *in utero* au DEHP entre 11 et 19 de gestation entraîne une augmentation de l'hépatostéatose (rétention des triglycérides dans les vacuoles hépatocytaires) ainsi que la réduction du stockage du glycogène dans le foie des fœtus. (Maranghi *et al.*, 2010).

Au niveau rénal, une augmentation du poids du rein et une minéralisation des papilles rénales sont essentiellement observées après des expositions chroniques au DEHP par voie orale chez le rat (ANSES (2012)).

III.8.2.4. Cancérogénicité

ANSES (2012), indique que le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a reclassé le DEHP en 2011 comme substance cancérogène possible pour l'Homme (du groupe 3 au groupe 2B) sur la base de données animales.

III.8.2.5. Génotoxicité/ Mutagenicite

L'ECB conclut que les études menées sur l'animal ne permettent pas de classer le DEHP parmi les substances génotoxiques ni mutagène.

III.8.2.6. Tératogénicité

Chez le rat et la souris, des effets tératogènes, incluant notamment une augmentation de la mortalité fœtale, du nombre de fœtus résorbés ou du nombre de malformations chez les survivants, ont été décrits suite à l'ingestion de DEHP (anses, 2012).

TRAVAIL EXPERIMENTAL

*Notre travail expérimental se divise en
deux grandes parties*

*A. L'étude de la reprotoxicité à faible
dose de DEHP chez le rat Wistar.*

*B. Application des méthodes
spectrométriques au suivi de la
migration du DEHP de PVC vers les
simulants des denrées alimentaires.*

PARTIE A

Etude de la reprotoxicité à faible dose de DEHP chez le rat Wistar exposé in utero

MATÉRIELS ET MÉTHODES

A) Etude de la reprotoxicité à faible dose de DEHP chez le rat Wistar exposé *in utero*.

Objectif

La concentration de spermatozoïdes décline jusqu'à 50% ces cinquante dernières années (**Carlsen et al.**, 1992). Parallèlement, la fréquence des cancers et des affections de l'appareil reproducteur mâle a augmenté dans l'espèce humaine (**RES**, 2013).

Plusieurs études expérimentales ont suggéré que les altérations de la fonction de reproduction mâle pourraient être dues aux « **Perturbateurs Endocriniens** » présents dans notre environnement.

Le DEHP est le perturbateur endocrinien le plus préoccupant, classé toxique pour la reproduction catégorie 1B sur la base des études toxicologiques chez le rat à des doses supérieures à la NAOEL.

Actuellement, il paraît qu'on rentre dans une nouvelle ère en toxicologie ; plusieurs études se penchent sur les effets des perturbateurs endocriniens à faibles doses et remettent en question les concepts actuels de l'évaluation des risques associés aux produits chimiques.

L'objectif principal de cette étude est d'identifier les risques d'une exposition *in utero* à une faible dose de **DEHP** sur le système de reproduction chez le rat Wistar.

L'étude de la toxicité pour la reproduction a été réalisée conformément à la ligne directrice de l'OCDE (2012), pour les essais de produits chimiques numéro 443 relatif à l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération.

A. I) Matériels et méthodes

A.I.1) Matériel

A.I.1.1) Matériel non biologique

- **DEHP** : la substance testée, liquide incolore visqueux de marque LG CHIMICAL
- **Huile d'olive** : utilisée comme véhicule.

A.I.1.2) Matériel biologique

Nous avons utilisé 14 rattes et 14 rats de souche Wistar sexuellement matures de poids corporel compris entre 200 et 207g, provenant de l'élevage du Centre de Recherche et de Développement SAIDAL (CRD). Les animaux ont accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau.

A.I.2.) Méthodologie expérimentale

Le protocole de l'expérimentation de l'étude de la reprotoxicité de DEHP chez le rat est résumé dans par le schéma suivant :

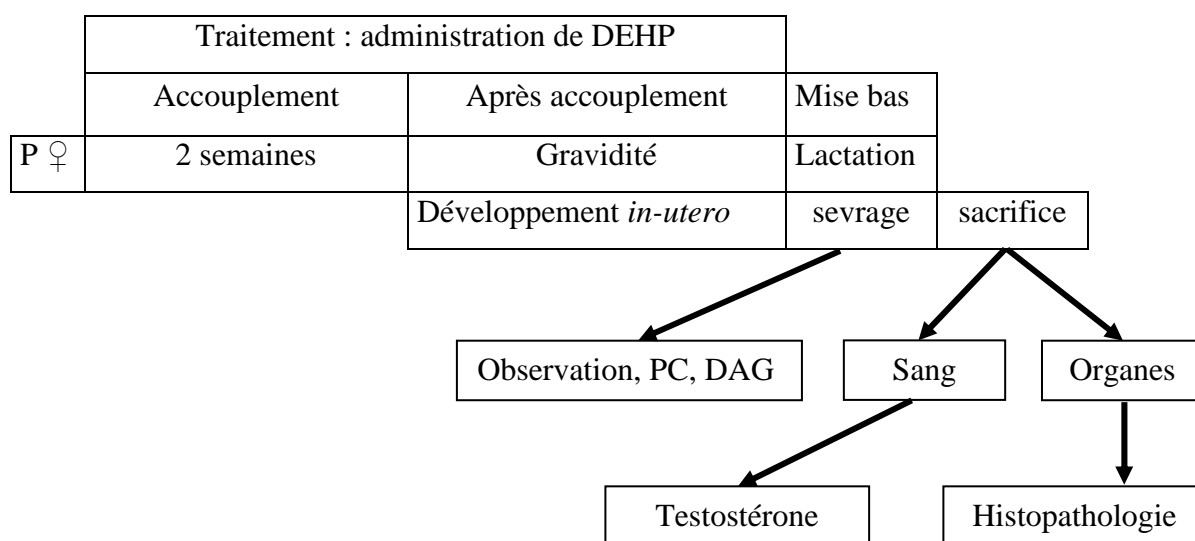


Figure 5: Organigramme de l'expérimentation

A.I.2.1) Les animaux

Les femelles sont réparties au hasard en deux groupes de manière à ce que les poids moyens de chaque groupe soient comparables ($\pm 20\%$ de la moyenne globale). L'un des groupes, servant de témoin (T) (7 femelles), reçoit de l'huile d'olive (véhicule). L'autre (7 femelles), servant de traités, reçoit le DEHP par gavage quotidien (voie orale) pendant l'accouplement et durant toute la période de gestation jusqu'à la mise bas. Les rats mâles ne sont pas traités, ils sont réservés uniquement pour l'accouplement.

Les animaux sont hébergés individuellement dans des cages en polypropylène et en polycarbonate présumées exemptes de phtalates. Chaque animal a été identifié avec un numéro unique sur la queue avant le début du traitement.

Les animaux témoins et traités sont pesés au moins une fois par semaine avant la gestation et au moins deux fois par semaine pendant la gestation.

A.I.2.2) Le choix de dose

Conformément à la définition de « faible dose », nous avons choisi la dose de 4mg /kg/j, inférieure à la NOAEL (5mg/kg/j) fixée par l'EFSA. Le choix de cette dose nous permet de se rapprocher plus de ce qui se passe dans notre environnement.

A.I.2.3) Préparation de la solution à administrée

La dose reçue par chaque femelle est calculée sur la base de poids corporel, et est ajustée au moins une fois par semaine pour les femelles non gravides et tous les deux jours pour les femelles gravides. Nous avons choisi l'huile d'olive comme véhicule, le volume de suspension (DEHP + huile d'olive) administré pour chaque femelle est de 1ml par un gavage quotidien 7jour sur 7 jusqu'à la mise bas.

Le calcul de la dose à administrer se fait comme suit :

Pour la dose 4 mg/kg/j au premier jour de l'expérimentation (par exemple) nous avons le poids moyen des femelle de 200g. En appliquant la règle de trois nous calculons la dose à administrée pour chaque femelle.

$$\left. \begin{array}{l} 4 \text{ mg} \longrightarrow 1000\text{g} \\ X \text{ mg} \longrightarrow 200\text{g} \end{array} \right\} X = 0,8 \text{ mg}$$

Donc la dose à administrée pour chaque femelle est de 0,8 mg de DEHP.

Pour préparer un volume Y de suspension (10 ml par exemple) on multiplie le X (0,8 mg) par Y le volume voulu (10 ml) on aura 8 mg de DEHP/ 10 ml de suspension.

Pour préparer la suspension, nous pesons 8 mg de DEHP dans une fiole puis nous ajustons jusqu'à 10 ml par l'huile d'olive, une petite agitation et la suspension est prête pour l'utilisation (gavage).

A.I.2.4) L'accouplement

L'accouplement a été fait en monogamie, un mâle pour chaque femelle, jusqu'à l'apparition des signes de grossesse. Le jour 0 de la gestation est celui où l'accouplement est avéré (observation de sperme ou d'un bouchon vaginal). Les femelles gravides sont séparées des males des qu'elles sont pleines.

A.I.2.5) Taille des portées

La taille des portées et le sexe des ratons sont déterminés le jour de la naissance (1JPN), les ratons sont pesés le 1JPN et 21JPN.

A.I.2.6) La distance anogénitale (DAG)

La DAG (distance entre l'anus et l'appareil génital) de chaque petit mâle a été mesuré le jour de sacrifice (21JPN) à l'aide d'un pied à coulisse, rapportée à la racine cubique de poids corporel comme l'indique l'article 45 de protocole de l'OCDE.

A.I.2.7) Prélèvement des échantillons

Tous les ratons mâles sont sacrifiés au 21JPN (sevrage) par décapitation pour éviter l'effet du stress. Le sang de la plaie est récupéré dans des tubes secs, placé à froid, puis centrifugé. Le sérum est congelé pour le dosage de la testostérone sérique. Les testicules sont

prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux s'il y en a puis pesés puis sont fixés dans du formol 10% pendant 24H pour l'analyse histologique.

A.I.2.8) Dosage de la testostérone sérique

Pour le dosage de la testostérone nous avons pris au hasard un (1) échantillon par portée. Le dosage à été fait par la technique chimiluminescence qui a un seuil de détection de 0,1 nmol/l. Cette technique est basée sur le principe de la compétition, réaction entre un anticorps et antigènes. La concentration en testostérone de l'échantillon est donnée directement en nmol/l.

- **Exploitation statistique des résultats**

Elle est effectuée à l'aide du test T de Student, $P \leq 0.05$ est considéré comme significatif. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm SEM, avec signalisation si la différence avec les témoins est significative ou non.

RESULTS

A.II) Résultats et discussion de l'étude toxicologique**A.II.1. Résultats****A.II.1.1. Résultats préliminaires**

Les différents résultats préliminaires de notre étude sont résumés dans le tableau XI

Tableau XI : Récapitulatifs des résultats préliminaires

		témoins	traités
avant accouplement	nombre de femelles parentes	7	7
	PC moyen (g)	207 ± 10,35	200 ± 5,14
	mortalités	0	0
gestation	% des femelles gestantes	100%	85,71 %
	retard à concevoir	–	+
	mortalités	0	0
mise bas	taille de portée	6 ± 2	5 ± 2
lactation et sevrage	mortalité au 1JPN	15	13
	nombre des rats survivants au 21JPN	20	12
	nombre des mâles au 21 JPN	9	7
	PC 1JPN (g)	5,95 ± 0, 22	5,22 ± 0,14
	PC 21 JPN (sevrage)	40,27 ± 2,03	25,13 ± 1,37

JPN= Jour postnatal

PC= Poids corporel

A.II.1.1.1) Pendant l'accouplement

L'exposition au DEHP pendant l'accouplement n'a aucune incidence significative sur l'évolution pondérale ni sur le comportement des animaux. Aucun signe de toxicité générale n'a été enregistré chez les traités.

A.II.1.1.2.) Gestation

Un taux de gestation de 100% à été observé chez les témoins et 85,71 % chez les traitées (Une femelle non gestante).

Pendant la gestation, aucune mortalité, aucun changement de comportement ni signe de toxicité générale n'a été observé chez les témoins, toutefois nous avons enregistré un petit retard à concevoir, chez les traitées.

A.II.1.2.3) Mise bas

La durée de la mise bas n'a pas été enregistrée, la taille des portées était différente chez les traitées par rapport aux témoins, néanmoins la différence n'est pas significative.

Quant aux mortalités nous avons enregistré dix (13) chez les nouveaux nés des traitées et quinze (15) chez les témoins.

L'exposition au DEHP *in utero* n'a pas d'incidence significative sur le poids des ratons à la naissance, toutefois nous avons observé une légère diminution chez les traités, en effet nous avons enregistré $5,22\text{g} \pm 0,14$ chez les traitées contre $5,95\text{g} \pm 0,22$ chez les témoins.

A.II.1.2) Poids corporel des ratons au 21 JPN

Nos résultats montrent que l'exposition *in utero* à une faible dose de DEHP (4mg/kg/j), a une incidence significative sur l'évolution pondérale des ratons traités par rapport aux témoins, en effet nous avons observé une diminution de 37,59 % de poids des traités par rapport aux témoins, le résultat est illustré par la figure 5.

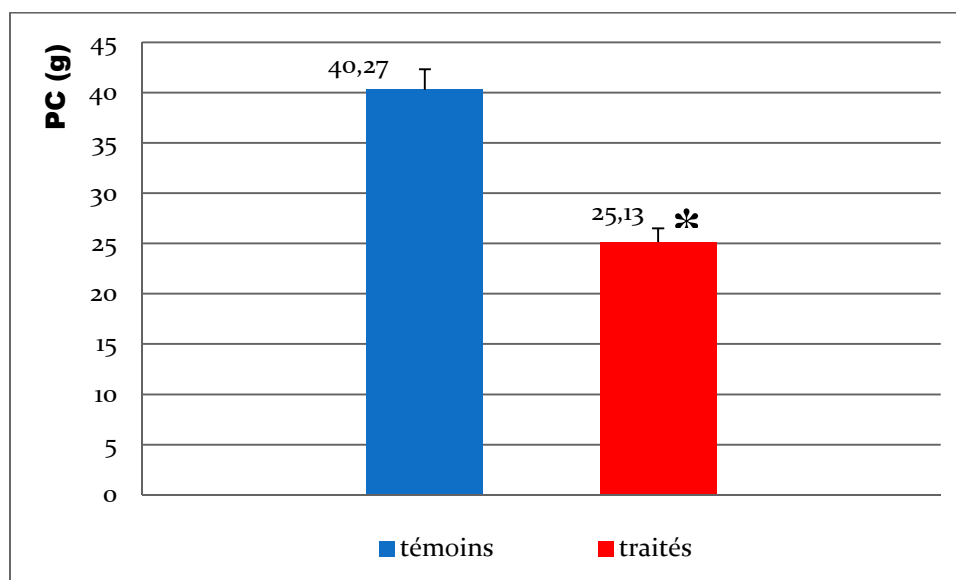


Figure 5 : Effet d'une exposition *in utero* à 4 mg/kg/j de DEHP sur l'évolution pondérale des ratons males au 21JPN.

A.II.1.3) Distance anogénitale DAG

La DAG mesurée au 21JPN, rapportée à la racine cubique du poids corporel, montre une diminution de 19,36%, statistiquement significative ($p < 0,05$) chez les traités par rapport aux témoins comme le montre bien la figure 6.

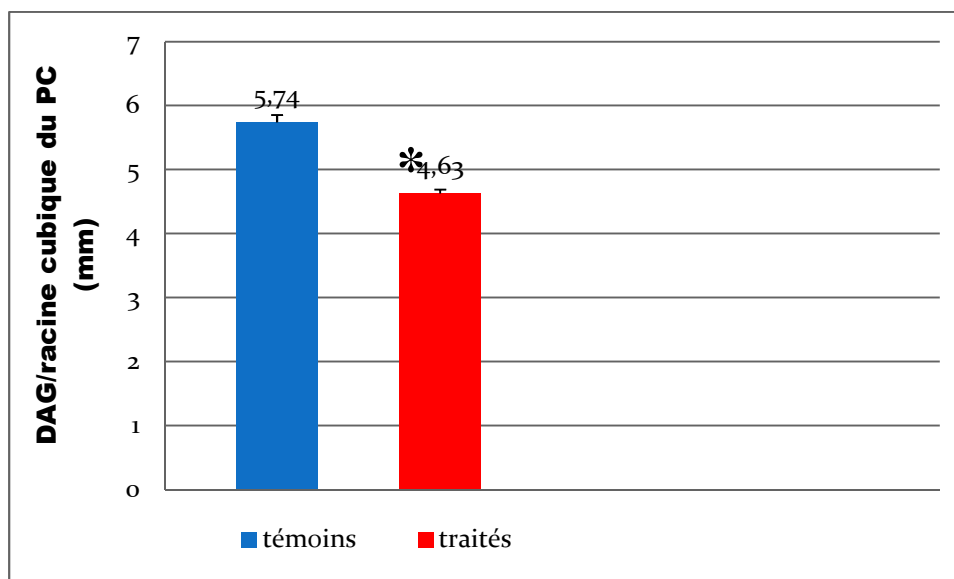


Figure 6 : Effet d'une exposition *in utero* à 4mg/kg/j de DEHP sur la DAG chez le rat male au 21 JPN.

A.II.1.4) Poids des testicules

Les poids relatifs des testicules montrent une diminution de 21,58 %, statistiquement significative chez les traités par rapport aux témoins. Les poids absolus quant à eux montrent une diminution hautement significative (90%) chez les traités par rapport aux témoins, les résultats sont illustrés sur la figure 7.

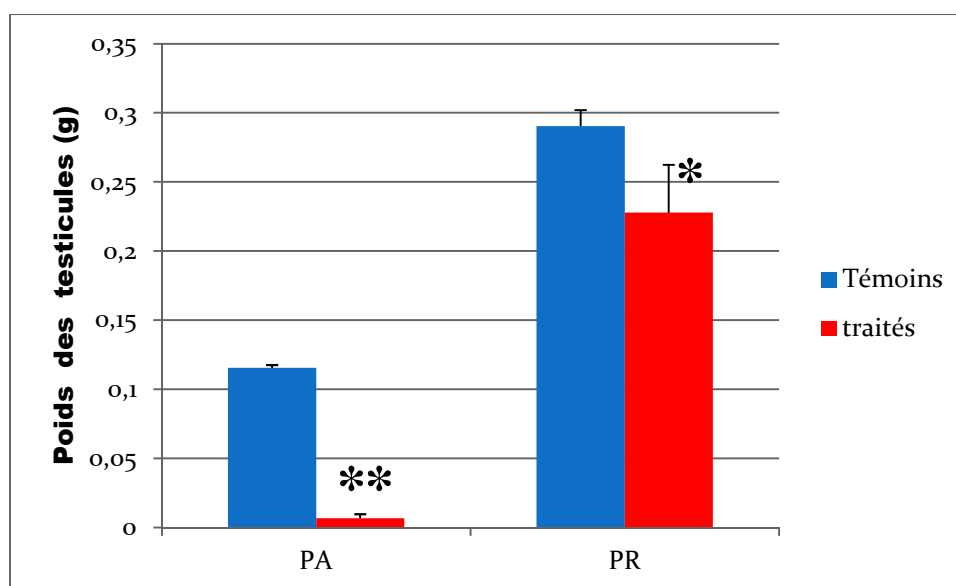


Figure 7 : Effet d'une exposition *in utero* à 4mg/kg/j de DEHP sur les poids relatifs et absolus des testicules chez le rat mâle de 21JPN.

A.II.1.5) Dosage de la testostérone

Le dosage de la testostérone chez les rats mâles exposés *in utero* à 4mg/kg/j au DEHP a montré une diminution de 47,49 %, statistiquement significative par rapport aux témoins.

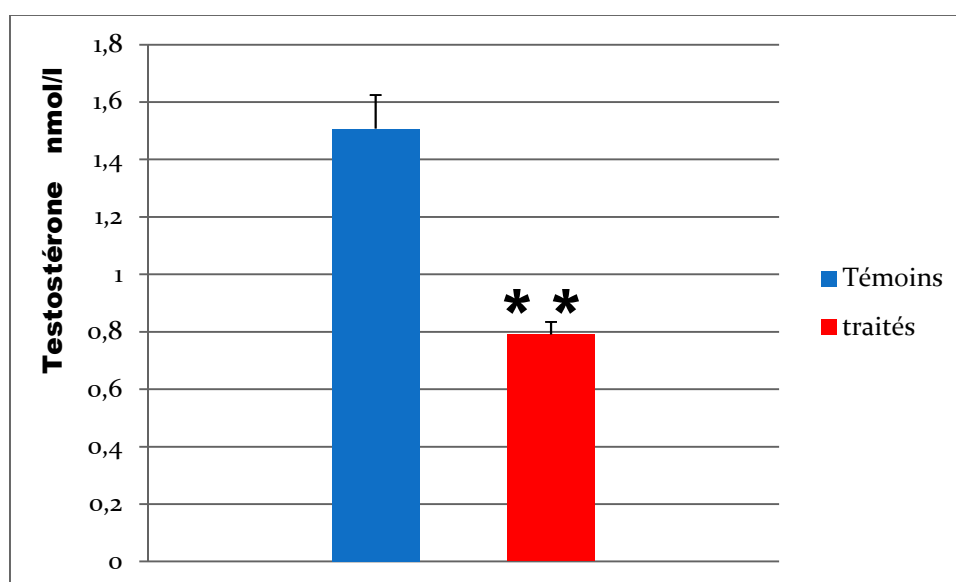


Figure 8 : Effet d'une exposition *in utero* à 4mg/kg/j du DEHP sur le taux de la testostérone chez le rat mâle au 21JPN.

DISCUSSION

A.II.2. Discussion

La physiologie de la fertilité chez les mammifères est très sensible aux perturbations de l'organisme par des agents exogènes (Jegou, 1996). Les phtalates, particulièrement le DEHP, sont des perturbateurs endocriniens, des contaminants ubiquitaires de notre environnement et classés comme de véritables agents toxiques préoccupants touchant la fertilité masculine (INSERM, 2011).

La vie intra-utérine est la fenêtre d'exposition la plus sensible par ce que les principales fonctions des testicules prennent place pendant la vie fœtale.

Ces dernières années plusieurs études concluent sur les effets à faibles doses des perturbateurs endocriniens, dans cette optique et pour se rapprocher plus de ce qui se passe dans notre environnement, nous avons voulu confirmer la présence ou l'absence d'effet du DEHP à une dose de 4mg/kg/j, dose inférieure à la NOAEL.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons enregistré une diminution significative du taux de la testostérone chez les animaux exposés à 4mg/kg pc/j par rapport aux témoins. Cette diminution pourrait être expliquée par l'action cytotoxique de DEHP sur les cellules des testicules responsables de la production de la testostérone. Il semble donc que l'exposition *in utero* à une faible dose de DEHP induit une défaillance hormonale sexuelle chez le rat.

La testostérone, selon Friry-Santini (2007), permet la différenciation, la croissance et le fonctionnement des organes reproducteurs. Ludwig (2011), indique que la production de testostérone au cours de la vie fœtale est responsable de la masculinisation du tractus génital et notamment la descente testiculaire.

- **DAG**

Les conséquences de la diminution de taux de la testostérone ont été clairement visibles chez les rats traités, en effet, nos résultats montrent une diminution significative de la DAG rapportée au poids corporel chez tous les rats mâles.

La DAG est un dimorphisme sexuel qui est sous le contrôle de taux de la testostérone, ce critère est utilisé comme indicateur sensible d'anti androgénicité, est un paramètre couramment décrit pour mesurer l'effet de l'exposition aux perturbateurs endocriniens.

D'après **Swan** (2011), DAG détermine la qualité du sperme, plus elle est importante meilleure est la qualité du sperme, les auteurs ont constaté que les hommes infertiles présentent toujours une DAG courte.

- **Poids des testicules**

Un autre paramètre qui a été fortement altéré par l'exposition au DEHP est le poids testiculaire, en effet nous avons observé une diminution significative des poids relatifs des testicules, chez les traités. Cette diminution pourrait être expliquée par l'action cytotoxique du DEHP qui entrave le développement des cellules testiculaires. La diminution du nombre et du volume des cellules testiculaires en fin de vie fœtale suite à une exposition *in utero* au DEHP est la cause de la diminution du poids des testicules et sera responsable de la diminution de la quantité du sperme à l'âge adulte. (**Fisher et al.**, 2003 ; **Jonhson et al.**, 2008 ; **Boekelheide et al.**, 2009).

Nos résultats prouvent donc les effets reprotoxiques d'une exposition *in utero* à faible dose de DEHP.

Ces effets délétères sur le système de reproduction (Diminution de la testostérone, de la DAG et du poids testiculaire) suite à une exposition *in utero* au DEHP sont regroupés sous le nom « *syndrome des phtalates* » (**Swan**, 2011).

Dans la littérature le « *syndrome des phtalates* » est rapporté de manière quasi-systématique chez le rat suite à une exposition *in utero* aux fortes doses de DEHP (**Gray et al.**, 2000 ; **Akingbemi et al.**, 2001 ; **Borch et al.**, 2004 ; **Anderson et al.**...2006 ; **Lin et al.**, 2008 ; **Saillenfait et al.**, 2008 ; **Drake et al.**, 2009 ; **Martino-Andrade et al.**... 2009 ; **Gray et al.**, 2009 ; **Lin et al.**, 2009 ; **Saillenfait et al.**, 2009 ; **Saillenfait**, 2010 ; **Vo et al.**, 2009a ; **Munczynski**, 2011).

A faibles doses le peu d'études qui traitent les effets reprotoxiques d'une exposition *in utero* au DEHP rapportent des résultats controversés. **Christiansen et al.**... (2010), ont rapporté le « *syndrome des phtalates* » à 3mg/kg/j de DEHP, chez le rat, suite à une exposition *in utero* chez le rat. **Sofie et al.**, (2010) ont observé le « *syndrome des phtalates* » uniquement à partir 10mg/kg/j, après une exposition *in utero* au DEHP à des doses de 3 à 500 mg/kg/j, d'après les auteurs les effets à 3 mg/kg/j ne sont pas significatifs.

En revanche, dans leur étude, **Anderson** et *al.*, (2006), ont rapporté une augmentation significative de la DAG à une dose très faible de 0,015mg/kg/j et augmentation significative du poids des testicules à 5mg/kg/j !

- **Poids corporel**

Bien que l'exposition au DEHP ne semble pas avoir d'effet significatif, sur le poids à la naissance, la croissance des rats est observée après la mise bas jusqu'au sevrage et montre que les mâles exposés au DEHP ont un poids corporel inférieur à celui des mâles du groupe témoins, en effet nous avons observé une diminution de 37,59%.

L'évolution pondérale est l'un des paramètres les plus difficiles à contrôler par ce qu'elle est influencée par plusieurs paramètres autre que l'exposition au DEHP, dans nos conditions expérimentales la diminution du poids corporel pourrait être la cause d'un mauvais allaitement ou le stress des animaux.

Dans la littérature, les données sont controversées concernant les effets du DEHP à faibles doses sur le développement, **Sofie** et *al.*, (2010) ont rapporté une diminution du poids corporel à 3mg/kg/j du DEHP au 21JPN, par contre, **Anderson** et *al.*, (2006) ont rapporté une légère augmentation du poids corporel à la naissance et aucune variation significative au 21 JPN ! **Saillenfait** et **Laudet-Hesbert** (2005) ont indiqué que l'exposition au DEHP provoque un retard de développement et de croissance. En opposition, **Saillenfait** et *al.*, (2009) ont rapporté une augmentation de poids dose dépendante. Cette divergence de résultats peut être due aux différences de conditions expérimentales qui portent sur la sensibilité des modèles biologiques utilisés (rats de souches différentes), et le stress des animaux pendant la période de l'expérimentation.

En ce qui concerne les différents résultats préliminaires, nous avons enregistré chez les traités un retard à concevoir qu' est un effet typique d'une exposition au DEHP, et plusieurs mortalités à la naissance chez les traités ainsi que chez les témoins qui pourraient être expliquées, dans nos conditions expérimentales, par un mauvais allaitement, la température de l'animalerie légèrement élevée et les mamans qui mangent leurs petits dans des conditions de stress.

Conclusion

En conclusion, dans nos conditions expérimentales, cette étude confirme les effets à faible dose de DEHP sur le développement et sur système de reproduction (diminution de taux de la testostérone, de la DAG et du poids des testicules) chez le rat exposé *in utero*, et souligne la vulnérabilité élevée pendant la période utérine.

Partie B

ESSAIS DE MIGRATION

MATERIEL ET METHODES

B. Etude de la migration de DEHP à partir d'un film en PVC plastifié vers quelques simulants de denrées alimentaires.

L'étude de la migration du DEHP a été réalisée conformément au règlement de 2011 de l'Union Européenne No 10/2011 de la commission du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.

B.I. Matériels et méthode

B.I.1. Matériels

Les deux matériaux utilisés sont des formulations industrielles des emballages alimentaires. Ceci permet de donner à cette étude un aspect plus appliqué et concret.

Les produits utilisés dans les films plastiques, les solvants et les milieux simulateurs d'aliments utilisés sont regroupés dans les tableaux XII, XIII et VIX.

Tableau XII: Produits utilisés

Produit	Nom commercial	Marque	Aspect
Di (2-ethylhexyl) phtalate (DEHP)	Diocylphtalate	LG CHIMICAL	Liquide incolore visqueux
Polychlorure de vinyle (PVC)	Polychlorure de vinyle	SHINTECH	Poudre blanche

Tableau XIII : Solvants utilisés

Solvant	Formule chimique	Pureté	Marque
Ethanol	CH ₃ CH ₂ OH	96°	Panreac
Tetrahydrofuranne (THF)	C ₄ H ₈ O	99,5%	Panreac

Tableau IVX : Simulants utilisés

Simulant	Abréviation	Denrées alimentaires
Ethanol à 50% (v/v)	D1	Moyennent grasses: Lait et produits laitiers. Boissons troubles: Jus, nectars et chocolat liquide, boissons alcoolisées titrant plus de 20 % vol. et toutes les liqueurs à base de crème.
Ethanol	D2	Graisses et huiles. Produits de la boulangerie, biscuiterie, pâtisserie présentant des matières grasses en surface, Chocolats, confiserie. Produits animaux et œufs. Poissons frais, réfrigérés, transformés, salés ou fumés. Viandes de toutes espèces zoologiques fraîches, réfrigérées, salées, fumées.
Eau distillée	ED	Boissons transparentes.

B.I. 2 Méthodologie des essais de migration

Nous avons réalisé des essais de migration en utilisant 10 films par chaque formulation pour chaque milieu simulateur d'aliment et conditions de contact prévue, afin de déterminer l'influence de la température, la durée de contact, la nature du milieu simulateur et la concentration de DEHP.

Notre étude est basée sur :

- Des essais de migration réalisés par immersion des films en PVC plastifié dans des milieux simulateurs d'aliments.
- Application des deux méthodes UV visible et FTIR au suivi de la cinétique de migration du DEHP dans les milieux sélectionnés et sur les films.

B.I.2.1. Préparation des films en PVC

Nous avons préparé des films en PVC à différentes concentrations en DEHP, l'ensemble est dissout dans du THF et soumis à une agitation, une solution homogène incolore est ainsi obtenue, nous avons versé des quantités 10 ml de cette solution dans des

boites de pétri en verre et laissées à température ambiante pendant 24h pour faire évaporer le solvant. En suite nous avons détaché les films secs du support en verre et nous les avons déposé sur un papier filtre et placés dans l'étuve à 60°C pour éliminer le solvant résiduel. En suite nous avons découpé les films en carrés de dimension (2x2 cm²).

B.I.2.2. Formulations réalisées

Nous avons préparé trois (3) formulations de concentrations différentes en DEHP, tel qu'il est mentionné dans le tableau 4.3

Tableau VX: Formulations réalisées

Nous avons réalisé trois formulations, 1% et 15% DOP, qui correspondent respectivement, au PVC rigide et semi rigide, et 30% DOP qui correspond au PVC plastifié.

	Formulations		
	F1	F2	F3
% de DEHP	1%	15%	30%

L'ensemble des essais de migration réalisés et les conditions de contact utilisés sont regroupés dans le tableau IVX.

Tableau IVX : Conditions et essais de migration réalisés

Durée de contact en jours [j] ou heures [h] à la température de contact [°C]	D1	D2	ED
Essais 2 h à 70 °C	F3	F1, F2, F3	F3
Essais 10 j à 50 °C	F3	F3	F3
Essais 10 j à 4°C	/	F3	/

B.I.2.3. La cellule de migration

Elle est constituée d'une série de tubes en verre à fermeture hermétiques, d'une série de films de masses proches et de liquide simulateur. Dans chaque tube nous avons introduit 10 ml de liquide et un film carré (2x2cm²).

Les prélèvements sont faits :

- Toutes les 10mn pour les essais de 2 heures.
- Toutes les 24 heures pour les essais de 10 jours.

Les films prélevés du simulant sont séchés à l'étuve pour éliminer les traces du solvant, et analysés par la spectroscopie FTIR. Les échantillons liquides obtenus sont conservés pour des analyses par UV.

B.I.2.4. Techniques d'analyses utilisées

B.I.2.4.1. Spectrométrie Infrarouge (IRTF/ATR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été appliquée aux films plastiques avant et après les essais de migration, à la résine de base et au DEHP.

La spectrométrie infrarouge permet d'identifier la nature des fonctions chimiques présentes au sein du polymère à partir de la détection des modes de vibration caractéristiques des liaisons chimiques. La spectrométrie infrarouge en mode transmission permet, en plus de l'identification des groupements fonctionnels, la détermination de leur concentration via la loi de Beer-Lambert.

Les spectres IR ont été réalisés au moyen d'un spectromètre IRTF de type (*Perkin Elmer Spectrum Two C 91380*) avec une résolution spectrale de 4 cm⁻¹, nombre de scan 30, dans un domaine de nombre d'onde s'étendant de 4 000 à 400 cm⁻¹.

Deux types de mesures ont été réalisés : une mesure en réflexion totale atténuée (RTA) à l'aide d'un cristal diamant (*Golden Gate Specac*), indice de réfraction égale 1, spécifique de l'analyse de surface, et une mesure en transmission où le faisceau traverse toute l'épaisseur de l'échantillon (films).

Le traitement des spectres infrarouges est effectué par le logiciel IR solution.

B.I.2.4.2. Spectrométrie ultraviolet (UV)

La spectrométrie ultraviolet-visible est une technique d'analyse dans laquelle les molécules, qui sont soumises à un rayonnement dans le domaine ultraviolet-visible (de 200 à 800 nm), subissent une transition électronique impliquant les photons.

Les analyses par spectrométrie ultraviolet ont été réalisées dans l'étude cinétique de la migration de DEHP dans les simulants utilisés.

Le balayage a été réalisé par un spectrophotomètre UV visible type SHIMADZU UV-1601 sur les solutions entre 200 et 400 nm.

B .I.2.4.2.1. Conditions opératoires et validation de la méthode

- **Choix de la longueur d'onde**

Afin de sélectionner des bandes spécifiques au DEHP, plusieurs solutions ont été préparées ;

- * Solution1 : 0.02mg/ml de DEHP dans l'éthanol
- * Solution2 : 0.02mg/ml de DEHP dans un mélange Ethanol/eau 50/50%
- * Solution3 : obtenue par chauffage à reflux pendant 2h d'un film en PVC vierge dans l'éthanol pur ;
- * Solution4 : obtenue par chauffage à reflux pendant 2h d'un film en PVC vierge dans un mélange Ethanol/eau 50/50%.
- * Solution 5 : 0.02mg/ml de DEHP dans l'eau distillée.

Un balayage a été réalisé par un spectrophotomètre UV visible type SHIMADZU UV-1601 sur les solutions entre 200 et 800 nm.

La vérification de certains paramètres de validation (ISO/CEI 17025 :2005) a été réalisée afin de s'assurer la fiabilité des résultats obtenues.

- **Linéarité de la méthode**

Pour la réalisation de l'étude, une gamme de dilution a été préparée dans les trois milieux de simulation ; les différentes solutions ont été analysées par spectrométrie dans l'UV-visible.

Le choix des concentrations a été fait de telle sorte que les absorbances soient linéaires en fonction de la concentration conformément à la loi de Beer – Lambert donnée par la formule :

$$A = \varepsilon l C$$

A : absorbance

L : le trajet optique (cm)

ε : coefficient d'extinction molaire ($l\ g^{-1}cm^{-1}$)

C : concentration (g/l)

- **Sensibilité de la méthode**

Pour étudier la limite de détection (la plus petite quantité qui peut être détectée et quantifiée), des dilutions successives ont été faites sur la plus petite concentration de la gamme d'étalonnage dans les trois milieux. Les différentes solutions obtenues ont été analysées par spectrométrie UV-visible.

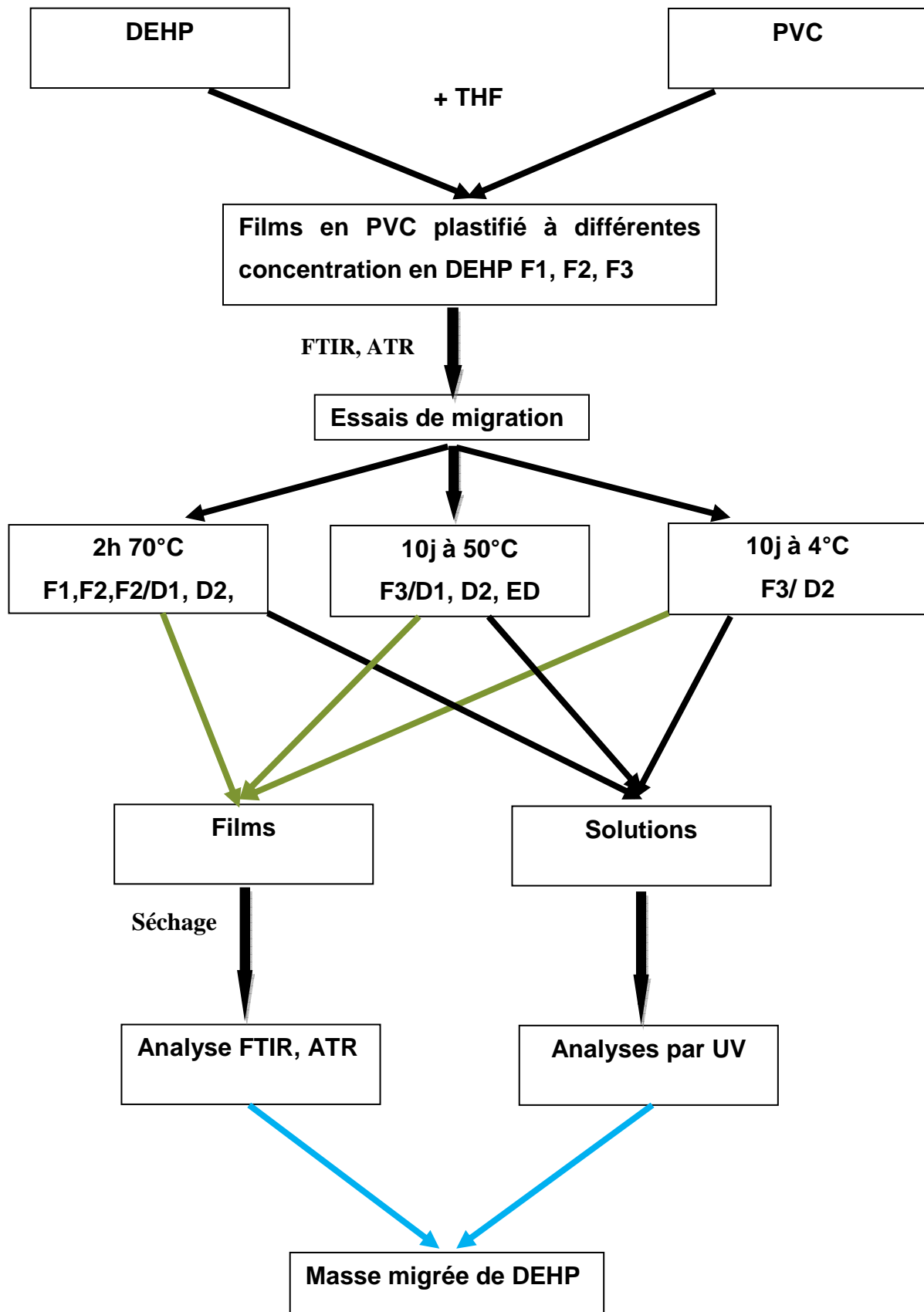
- **Spécificité de la méthode**

La spécificité a été vérifiée par balayage réalisé par spectrométrie sur la solution 4.

Les résultats de la validation de la méthode UV sont donnés en ANNEXE A.

Des solutions étalons ont été préparées pour chaque milieu simulateur, par dilution à partir d'une solution mère contenant une concentration connue en DEHP. Les courbes d'étalonnage sont représentées en ANNEXE B.

Organigramme récapitulatif de la partie expérimentale



RESULTATS ET DISCUSSION

B.II. RESULTATS ET DISCUSSION

B.II.1. Résultats de la caractérisation initiale

B.II.1.1. Caractérisation par la spectroscopie FTIR/ ATR

La caractérisation a été effectuée sur le DOP, la poudre de PVC et les films en PVC avec et sans DOP.

Pour caractériser nos matériaux, poudre de PVC et DOP nous avons eu recours à la spectrométrie IR en mode réflexion (ATR).

B.II.1.1.1. Caractérisation de la poudre de PVC

La spectroscopie ATR de la poudre de PVC a donné le spectre illustré par la figure 9, Dans une première étape, nous avons vérifié l'existence des bandes d'absorption IR caractéristiques du PVC dans la région $600-700\text{ cm}^{-1}$ (zone X dont le zoom est illustré par la figure 10). En effet, c'est dans cette région, que figurent les trois vibrations d'élongation de la liaison C-Cl. Ces bandes sont à $690, 635$ et 615 cm^{-1} , d'après le spectre de référence Aldrich, elles sont clairement mises en évidence sur le spectre, ce qui confirme que notre matériau est bien du PVC.

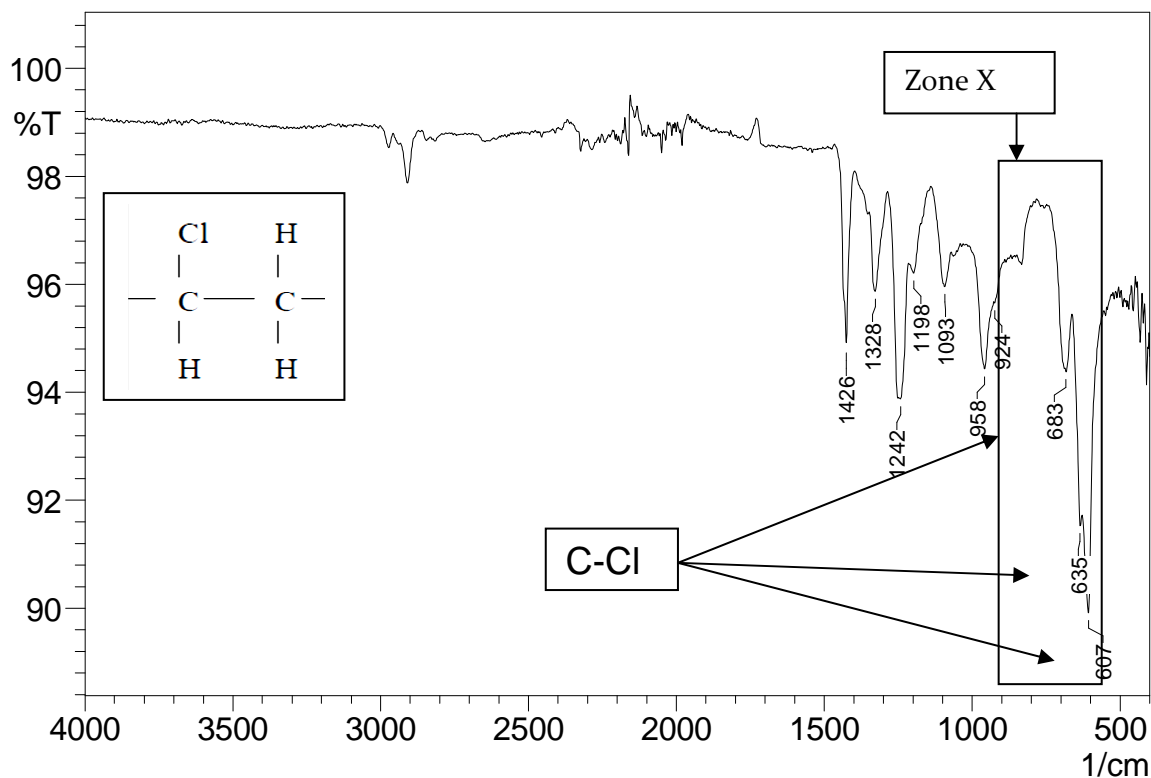


Figure 9 : Spectre ATR de la poudre de PVC

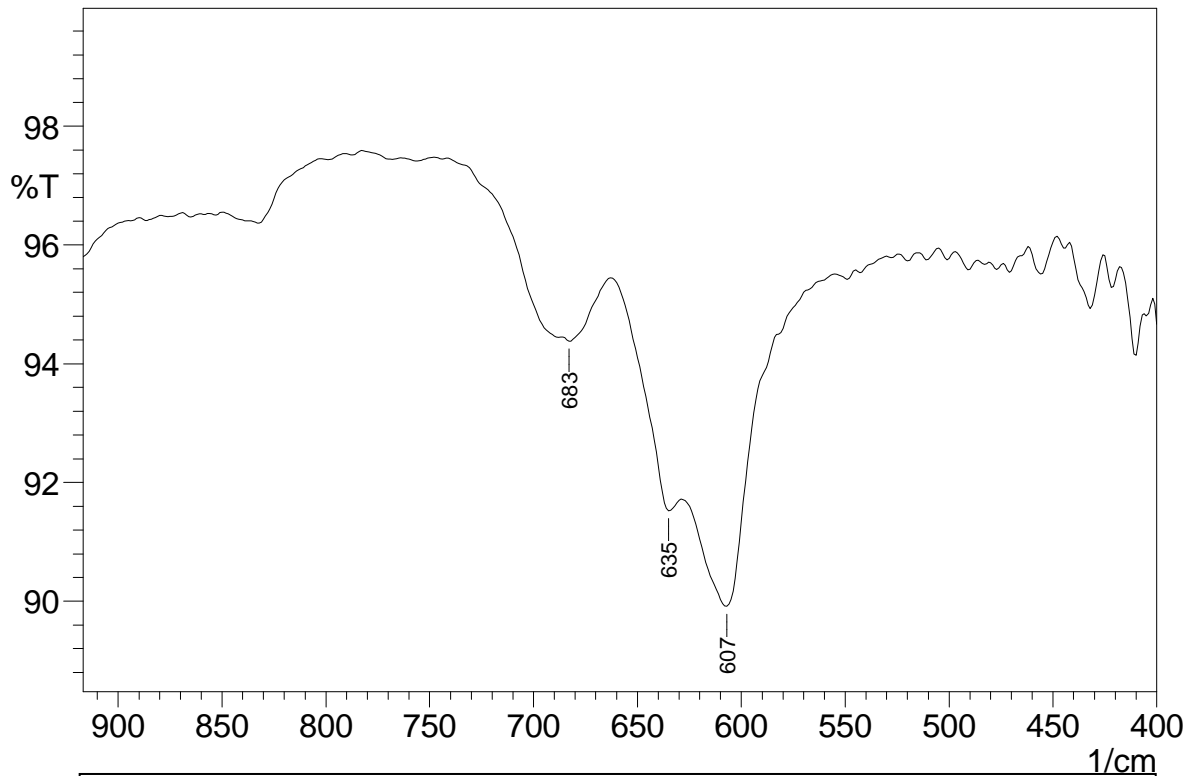
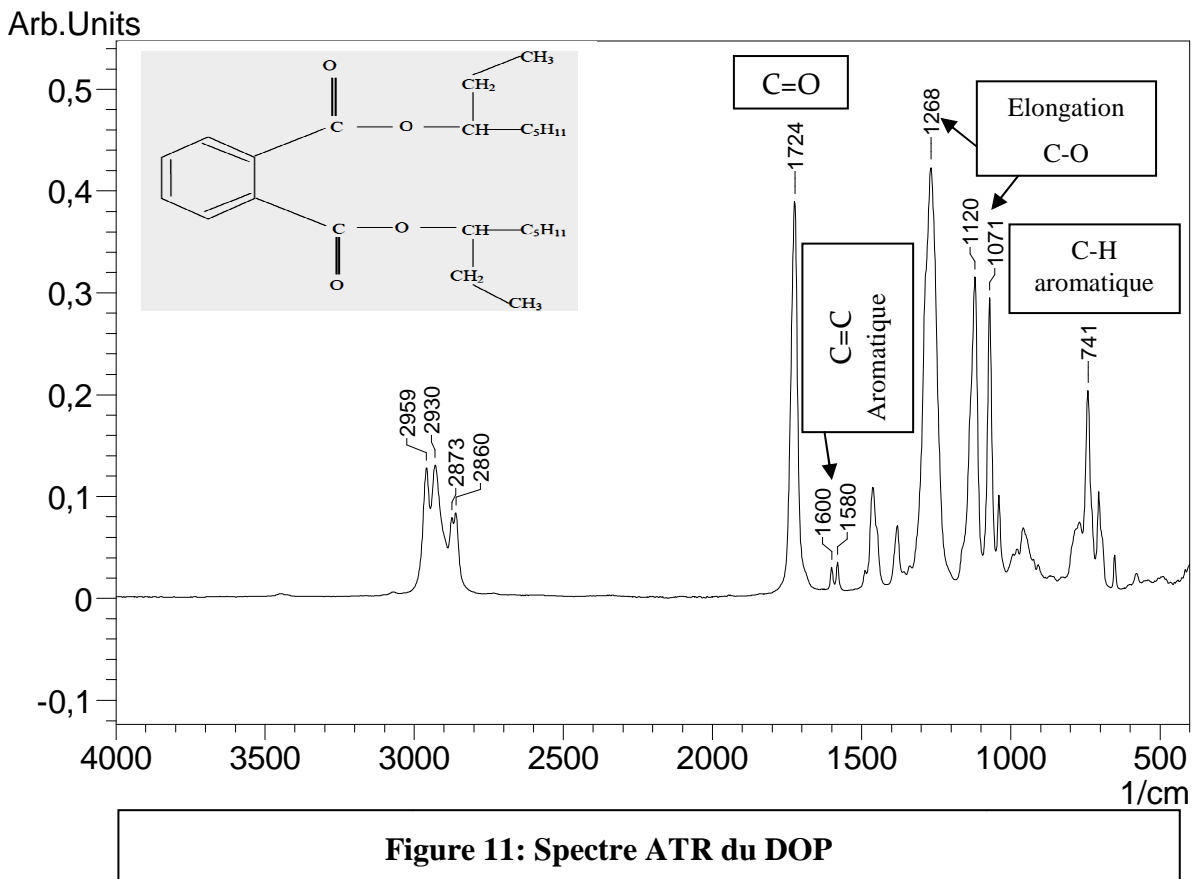


Figure 10: Zoom de la zone X du spectre ATR de la poudre de PVC

B.II.1.1.2. Caractérisation du DOP

L'analyse du DOP par la spectroscopie ATR a donné le spectre illustré par la figure 11. Nous retrouvons dans notre DOP toutes les bandes caractéristiques identifiées par **ALDRICH**, les attributions des bandes d'absorptions aux groupements fonctionnels ont été faites en se référant aux travaux de **Tabb et Koenig**, (1975) menés sur un PVC plastifié par le DOP.



B.II.1.1.3. Comparaison des spectres FTIR du PVC avec et sans DOP

Les spectres FTIR du PVC avec et sans DOP sont illustrés par la figure 12, la superposition des deux spectres nous a permis d'identifier les bandes caractéristiques du DOP les plus intenses pour le suivi de la migration. On observe nettement que la présence du DOP est bien marquée par la bande caractéristique, la plus intense, de la fonction carbonyle (C=O) à 1720 cm^{-1} , ainsi que par les deux bandes de la fonction (C=C) aromatique à 1580 et 1600 cm^{-1} .

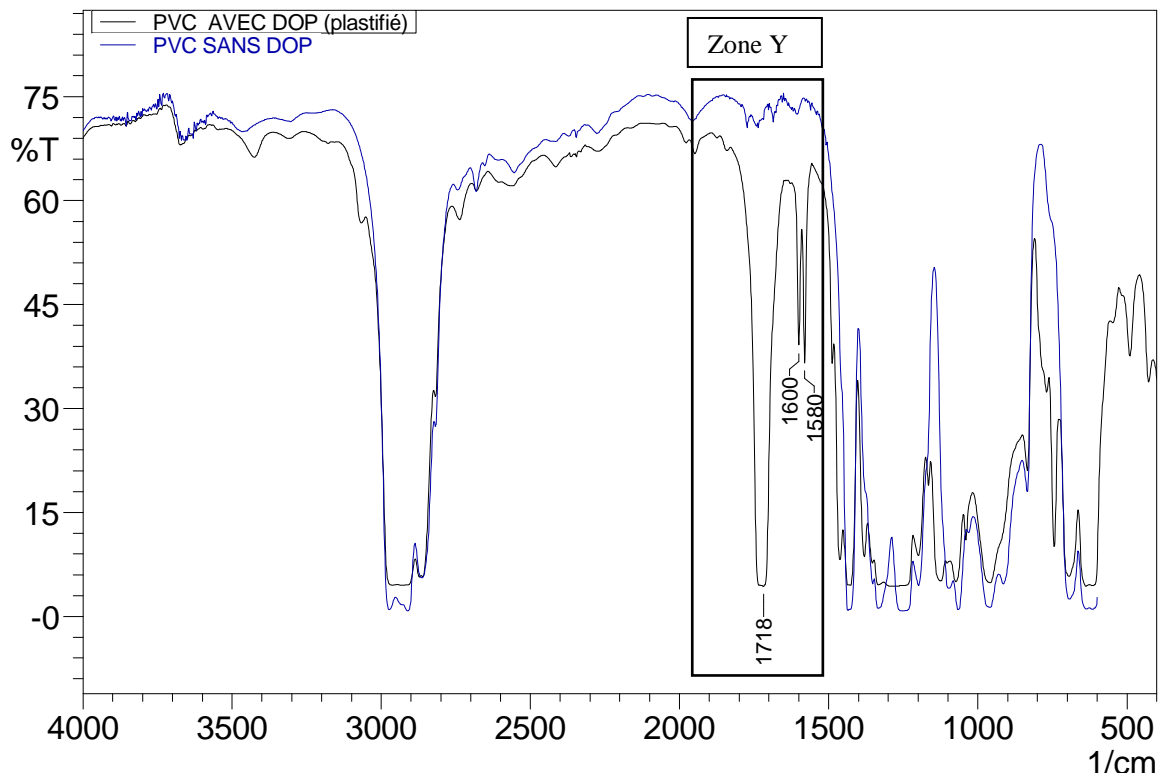


Figure 12: Spectre FTIR du PVC avec et sans DOP

Le zoom de la zone spectrale Y illustré par la figure 13, permet de visualiser nettement les bandes caractéristiques du DOP dans le PVC plastifié, 1720, 1580 et 1600 cm^{-1} .

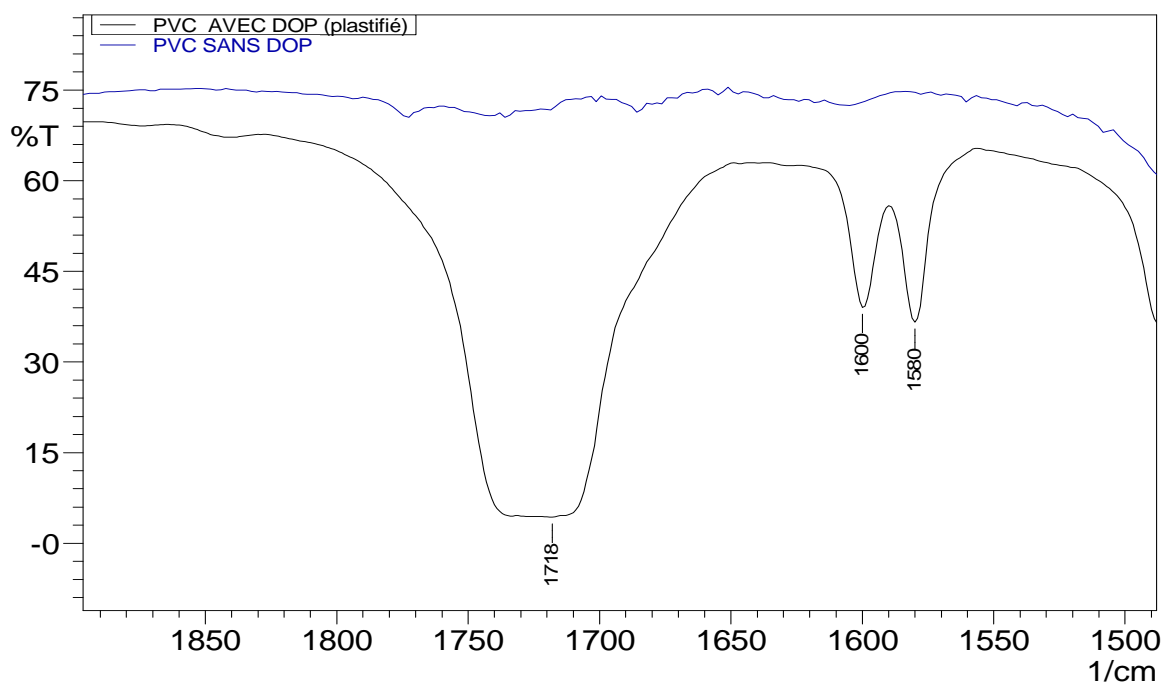


Figure 13: Zoom de la zone Y des spectres FTIR du PVC avec et sans DOP.

B.II.1.1.4. Comparaison des spectres FTIR des films correspondant aux différentes concentrations du DOP réalisées.

Afin d'observer les modifications spectrales des films aux différentes concentrations du DOP (1-15-30%), nous avons comparé l'aire des bandes caractéristiques sélectionnées du DOP, comme il est illustré par la figure 14, on observe nettement que la surface des bandes évolue avec la concentration du DOP.

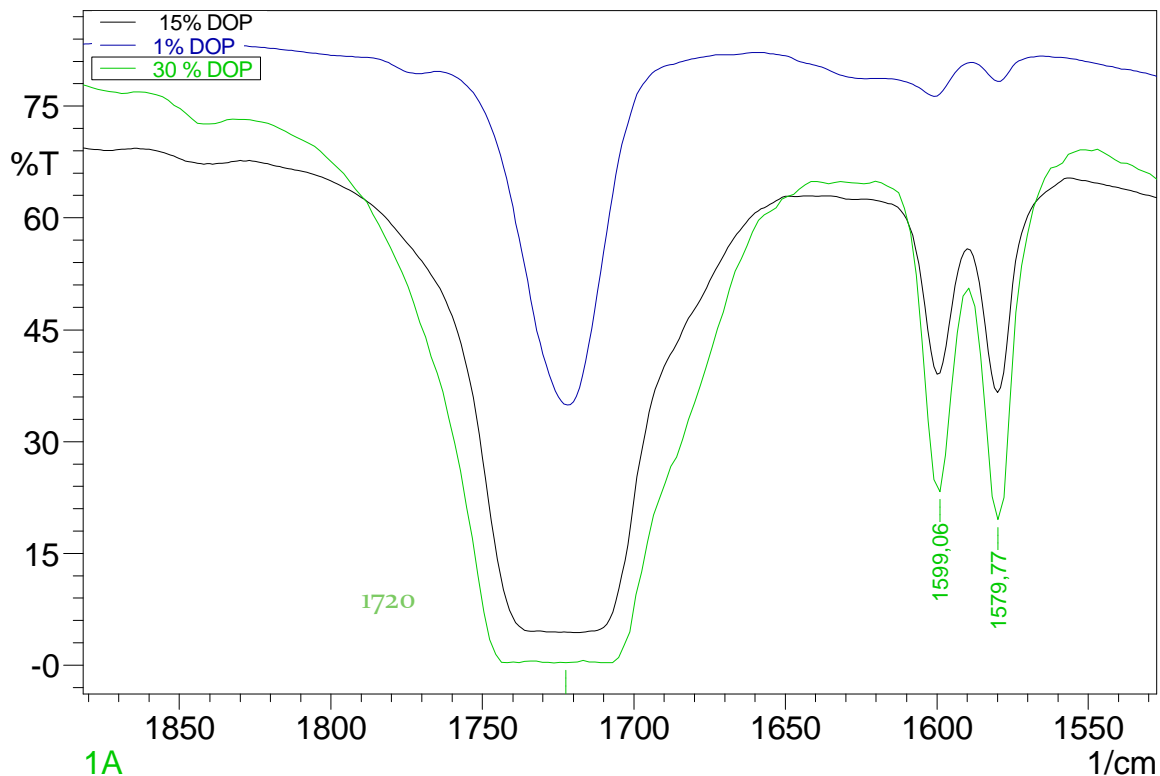


Figure 14: Spectres FTIR des bandes caractéristiques des films aux différentes concentrations du DOP.

B.II.1.2. Caractérisation du DOP par la spectroscopie UV

Une solution de 0.02 mg/ml du DOP dans l'éthanol a été préparée et analysée par un balayage dans la zone spectrale comprise entre 200 et 400 nm.

Le spectre obtenu (illustré par la figure 15), est conforme au spectre UV de référence cité dans le **répertoire UV and IR Spectra Pharmaceutical Substances**, il présente deux maximums d'absorptions à $\lambda_{\max} \approx 225\text{nm}$ et $\lambda_{\max} \approx 276\text{nm}$.

Les deux maximums d'absorptions observés peuvent être choisis pour l'analyse du DOP dans les différents milieux étudiés.

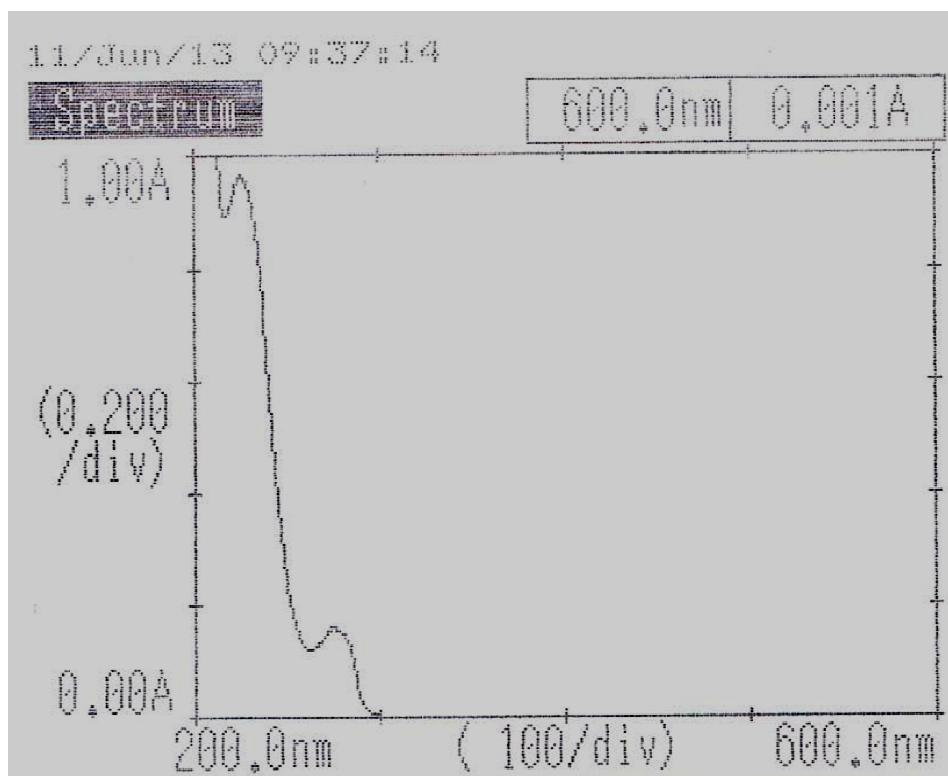


Figure 15: Spectre UV du DOP dans l'éthanol.

B.II.2. Etude cinétique de la migration du DOP par la spectroscopie UV

L'ensemble des échantillons des simulants des essais de migration réalisés ont été analysés par la spectroscopie UV à 225 nm et à 276nm. L'exploitation des résultats a permis d'observer l'effet de la concentration de DOP, de la nature du milieu simulateur et de la température sur le phénomène de migration de DOP.

B.II.2.1 : Effet de la concentration en DOP

Pour voir l'effet de la concentration en DOP sur la migration, nous avons réalisé l'essai de 2h à 70°C dans un seul milieu simulateur, éthanol 96°, avec des films en PVC aux concentrations 1%, 15% et 30 % DOP, Afin de bien illustrer l'effet de la concentration sur la migration du DOP, nous avons comparé les résultats obtenus à $\lambda = 225\text{nm}$, qui est plus spécifique au DOP, la 276 nm est communes à d'autres additifs des matériaux plastiques comme l'irganox. Les résultats sont illustrés par la figure 16.

L'évolution du taux de migration observée dans l'éthanol 96 % à 70°C en contact des films contenant 1%, 15% et 30% de DOP est croissante en fonction de la concentration du plastifiant comme le montre la (figure 16), on observe qu'à l'équilibre, la migration du DOP atteint 20,6%, 45,2% et 87,8% respectivement pour les préparations à 1%, 15% et 30% en DOP.

Nos résultats montrent que, quelle que soit la concentration du DOP dans les films, l'éthanol provoque une migration importante à 70°C.

Le classement par ordre croissant des % de migration du DOP en fonction de la concentration est :

$$1 \% < 15 \% < 30\%$$

Ces résultats concordent avec la littérature qui mentionne que la migration augmente avec la quantité de plastifiant dans le matériau. (Sidman et al... (1981) ; Fayolle 2005, Yu et Selvadurai 2005).

- **30 % DOP**

Le PVC à 30% DOP est un PVC plastifié, il se caractérise pas une grande souplesse, et un espace inter chaîne important par conséquent pénétration facile et rapide de solvant, ce qui s'est traduit par un taux de migration important 87,8%.

Fayolle (2005), a indiqué que le PVC plastifié se caractérise par une mobilité moléculaire élevée et par un espace inter chaîne important, par conséquent, par de nombreux volumes accessibles à la diffusion ce qui se traduit par une migration importante.

- **1 % DOP**

Le PVC à 1% DOP c'est un pvc rigide, il se caractérise par une cristallinité élevée qui constitue une barrière contre la migration, **Grégory** (2009), précise que la cristallinité diminue la migration, en effet, les zones cristallines sont imperméables au solvant, les chaînes de polymère sont serrés entre elles et donc l'espace vide est très réduit, pas ou peu pénétration de solvant, ce qui donne migration très petite.

- **15 % DOP**

Le PVC 15 % DOP est un PVC semi rigide, il se caractérise par une cristallinité plus au moins élevée, par conséquent le vide intermoléculaire est faible ce qui donne une migration faible. **Grégory** (2009), a expliqué que le solvant pénètre peu dans le pvc semi rigide ce qui se traduit par une faible migration de plastifiant.

Dans leurs travaux, **Sidman** et *al...* (1981), ont mentionné que la migration du DOP est très réduite aux basses concentrations.

Néanmoins, dans nos conditions expérimentales, nous avons obtenu un taux de migration de 20% dans le cas de PVC à 1% DOP et 45% dans le cas de PVC à 15% DOP. Ces résultats pourraient être dus à l'effet additionné de la température (70°C) et l'utilisation d'un solvant (éthanol 96°) qui a une grande affinité pour le DOP, ou encore la contamination des solutions par les phtalates qui sont des contaminants ubiquitaires de l'environnement.

En effet, la température de 70°C est supérieure à la tg de PVC (qui est de 60°C d'après **Mark** (1999)), ce qui ramollit d'avantage le pvc (rigide et semi-rigide) et favorise la pénétration de l'éthanol à l'intérieur par conséquent migration du DOP. **Pfab** (1973) suggère que la migration est beaucoup plus importante dans un polymère quand la température est supérieure à la tg. L'auteur précise que Tg diminue avec l'augmentation de la concentration du DOP ce qui rend le pvc plus flexible et favorise la migration.

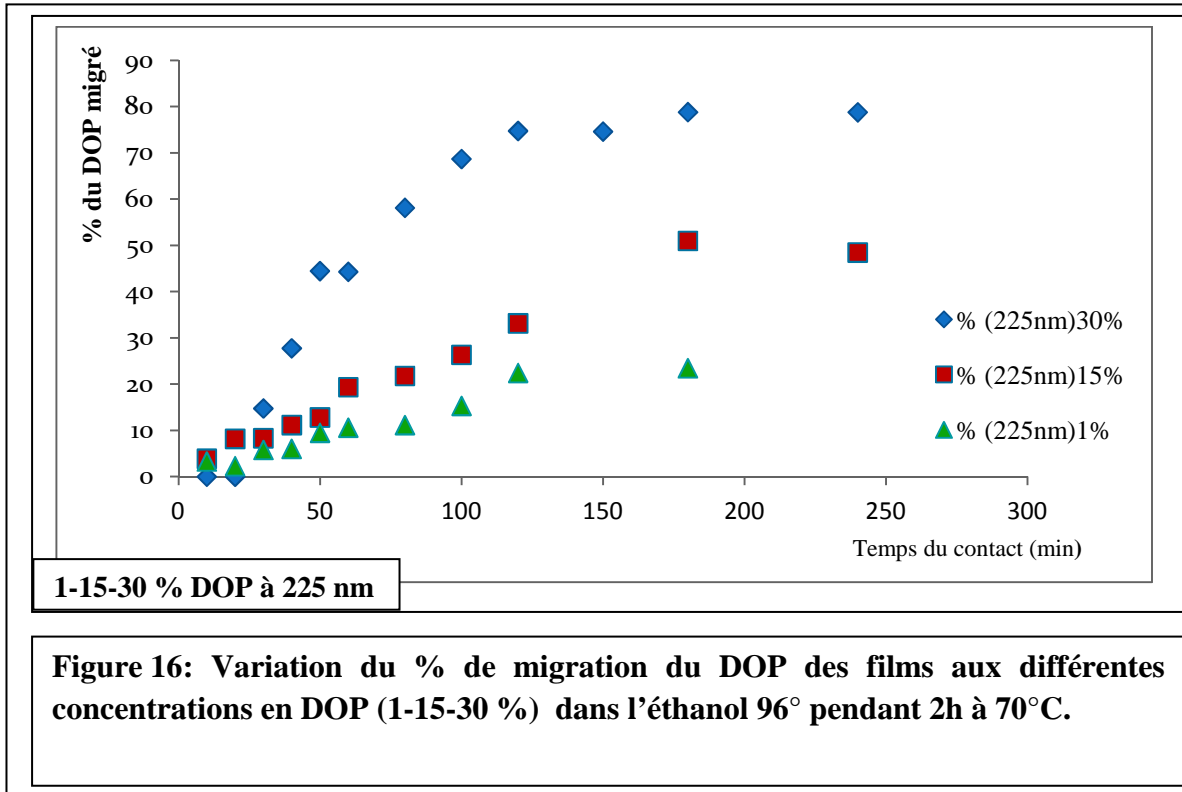


Figure 16: Variation du % de migration du DOP des films aux différentes concentrations en DOP (1-15-30 %) dans l'éthanol 96° pendant 2h à 70°C.

B.II.2.2 : Effet du milieu simulateur

Pour voir l'effet du milieu simulateur sur la migration nous avons réalisé les essais avec une seule concentration (30% DOP) dans : Ethanol 96° qui représente les aliments gras, éthanol 50% qui représente les aliments moyennement gras et l'eau distillée qui représente les boissons transparentes.

- **Essais à 70°C**

La nature du milieu de contact est l'un des paramètres les plus importants qui déterminent la migration; nos résultats montrent que le taux de migration du DOP diminue lorsque la proportion d'eau augmente dans le milieu en contact ; le taux passe de 78% dans l'éthanol 96° à 20% dans l'éthanol /eau 50/50 pour atteindre 0.3% dans l'eau distillée, comme le montre la figure 17. Le classement par ordre croissant des % de migration du DOP dans les simulants utilisés est :

ED < Ethanol 50 % < Ethanol 96°.

Ceci concorde parfaitement avec la littérature qui rapporte une diminution de la migration lorsque la quantité de l'éthanol diminue et la quantité d'eau augmente dans le milieu (Pfab 1973; Yu et Selvadurai 2005).

- **Ethanol 96°**

Le taux de migration le plus important (78%) a été observé dans l'éthanol 96°, ceci est dû au caractère lipophile du DOP qui a une grande affinité pour l'éthanol. ANSES (2012) a indiqué que le DOP est une substance lipophile, elle a plus d'affinité pour les matières grasses représentées par le solvant éthanol.

Grégory (2009), a indiqué que capacité de solvant à dissoudre l'additif détermine la migration. Dans le même sens, Feigenbaum et al., (1993) ont indiqué que le milieu de contact et le caractère lipophile du migrant sont des paramètres importants qui déterminent la migration, ces auteurs ont indiqué que, même si la migration est possible dans les aliments aqueux, ils migrent davantage dans les aliments gras.

- **Ethanol 50%**

Dans le milieu éthanol 50%, nous avons observé un taux de migration quatre fois moins que celui observé dans l'éthanol, (20% dans éthanol 50% contre 78% dans éthanol 96°). Aussi nous avons observé la réprécipitation du DOP dans ce milieu alors que les

solutions ont resté limpides dans l'éthanol 96°. Ceci est dû à la quantité importante d'eau dans le milieu (50% d'eau), ce qui diminue le pouvoir de solubilité de l'éthanol et son affinité pour le DOP, par conséquent diminution de taux de la migration. En effet, d'après **Fayolle** (2005), la dilution de l'éthanol par l'eau conduit à la diminution de son pouvoir de solubilité et donc diminution de sa capacité à extraire l'additif.

- **Eau distillée**

Le taux de migration du DOP obtenu dans l'eau distillée (0,3 %), est le plus faible par rapport aux autres simulants. Ceci est dû au fait que le DOP est une substance hydrophobe, il présente une très faible solubilité dans l'eau (0,27mg/l) (**CIRC** 2012). **Boussoum** (2010) a rapporté des valeurs d'extraction de DOP dans l'eau distillée entre 0,00 % et 2,05%.

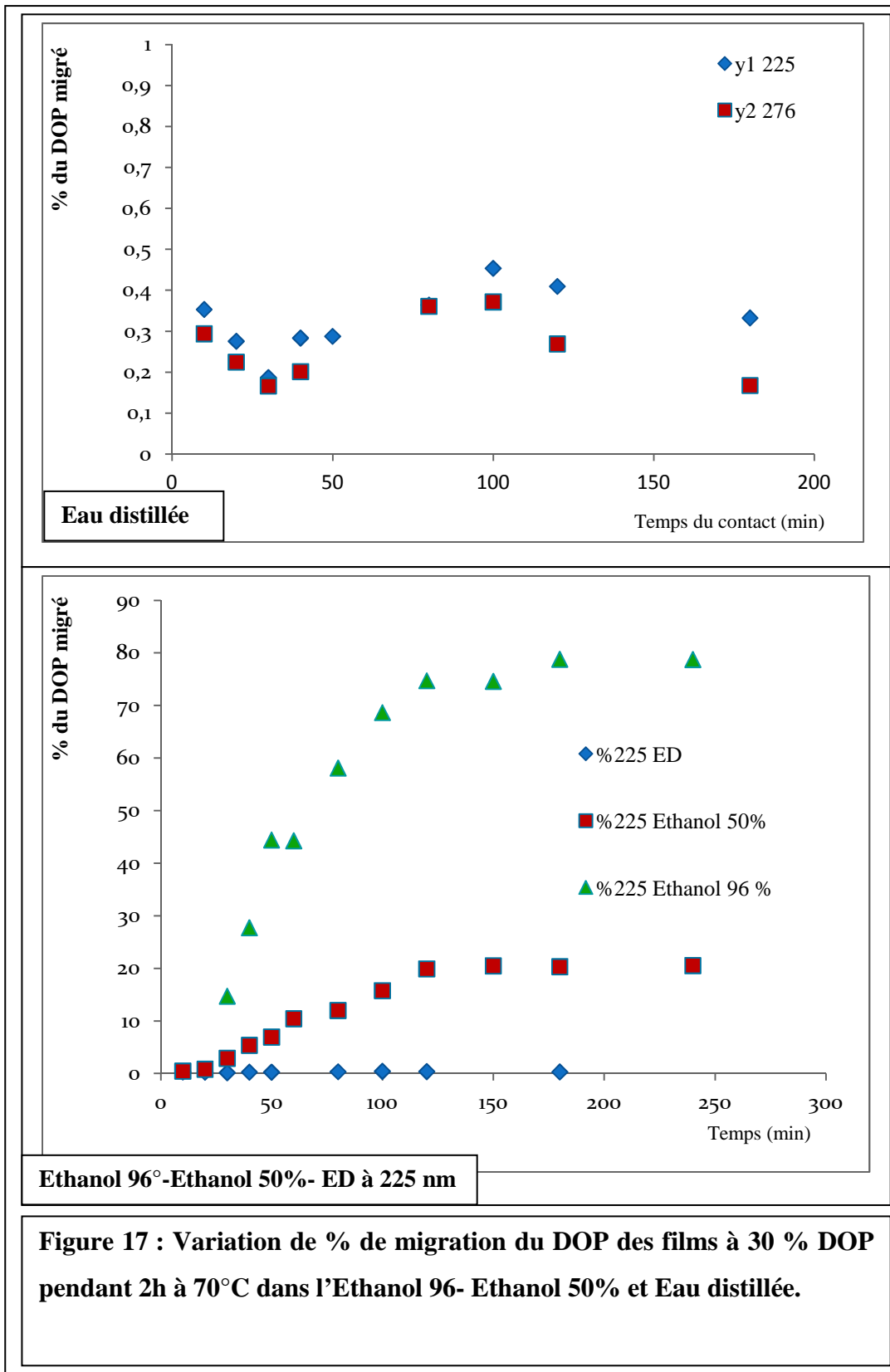


Figure 17 : Variation de % de migration du DOP des films à 30 % DOP pendant 2h à 70°C dans l’Ethanol 96- Ethanol 50% et Eau distillée.

B.II.2.3 : Effet de la température

La température est un autre facteur très déterminant dans le phénomène de migration du DOP. Pour voir ses effets, nous avons réalisé les essais de 10 jours à 4°C dans l'éthanol 96° et dans l'eau distillée à 50°C, avec les films à 30% DOP. Nous avons comparé les résultats obtenus à ceux que nous avons eu à 70°C pendant 2h dans les mêmes milieux. La variation de taux de la migration en fonction de la température est illustrée par la figure 18.

- **4°C et 70°C/Ethanol 96°C.**

La migration du DOP des films en PVC plastifié à 30% DOP, dans l'éthanol 96° à 4°C est croissante en fonction du temps, comme le montre la figure 18 (a), plus de 20 % du DOP a été migré dans le 1^{er} jour et presque la moitié (46%) au bout de 9eme jours. Ces résultats indiquent que dans le milieu éthanol (matières grasses) la migration du DOP des films en PVC plastifié est aussi importante même aux températures de réfrigération (4°C). Ceci est du au caractère lipophile du DOP et sa grande affinité pour l'éthanol, aux quels s'ajoute le degré de plastification (30% DOP) qui favorise la migration (comme nous l'avons déjà expliqué dans l'effet de la concentration).

Cependant le taux reste inférieur par rapport à celui observé dans le même milieu à 70°C, comme le montre la figure (c), il diminue presque de la moitié, il passe de 78% à 70°C à 46 % à 4°C. Ces résultats montrent que la température de réfrigération (4°C) diminue le taux de migration du DOP des films en PVC plastifié dans le simulant des matières grasse mais ne l'inhibe pas !

La cinétique de migration à 4°C est n'est pas régulière (figure 18 a) contrairement à celle observée à 70°C qui est nette puis arrive au seuil ou l'équilibre est atteint ; Ceci pourrait être attribué aux fluctuations de la température de réfrigérateur provoquées par les coupures d'électricité.

4°C est une température largement inférieure à la tg de PVC, ce qui garde les films fermes et augmente leur rigidité, par conséquent diminue ou ralentit la migration.

- **50°C et 70°C / Eau distillée.**

La cinétique de migration dans l'eau n'est pas linéaire comme le montre les figures (18 d et e). Les taux de migration du DOP des films en PVC plastifié à 30% DOP, dans l'eau distillée à 50°C sont trop faibles voire même négligeables, un taux de 0,27 % a été observé la fin des essais (10eme jours), comme le montre la figure (18 e). A 70°C le taux de migration reste toujours très faible et proche de celui obtenu à 50°C, nous avons observé 0,3% à la fin des essais à 70°C et 0,27% à 4°C, comme l'illustre la figure (b). Ces valeurs restent proches et négligeables et montrent que la température n'influence pas la migration dans le cas de l'eau qui ne présente aucune affinité pour le DOP.

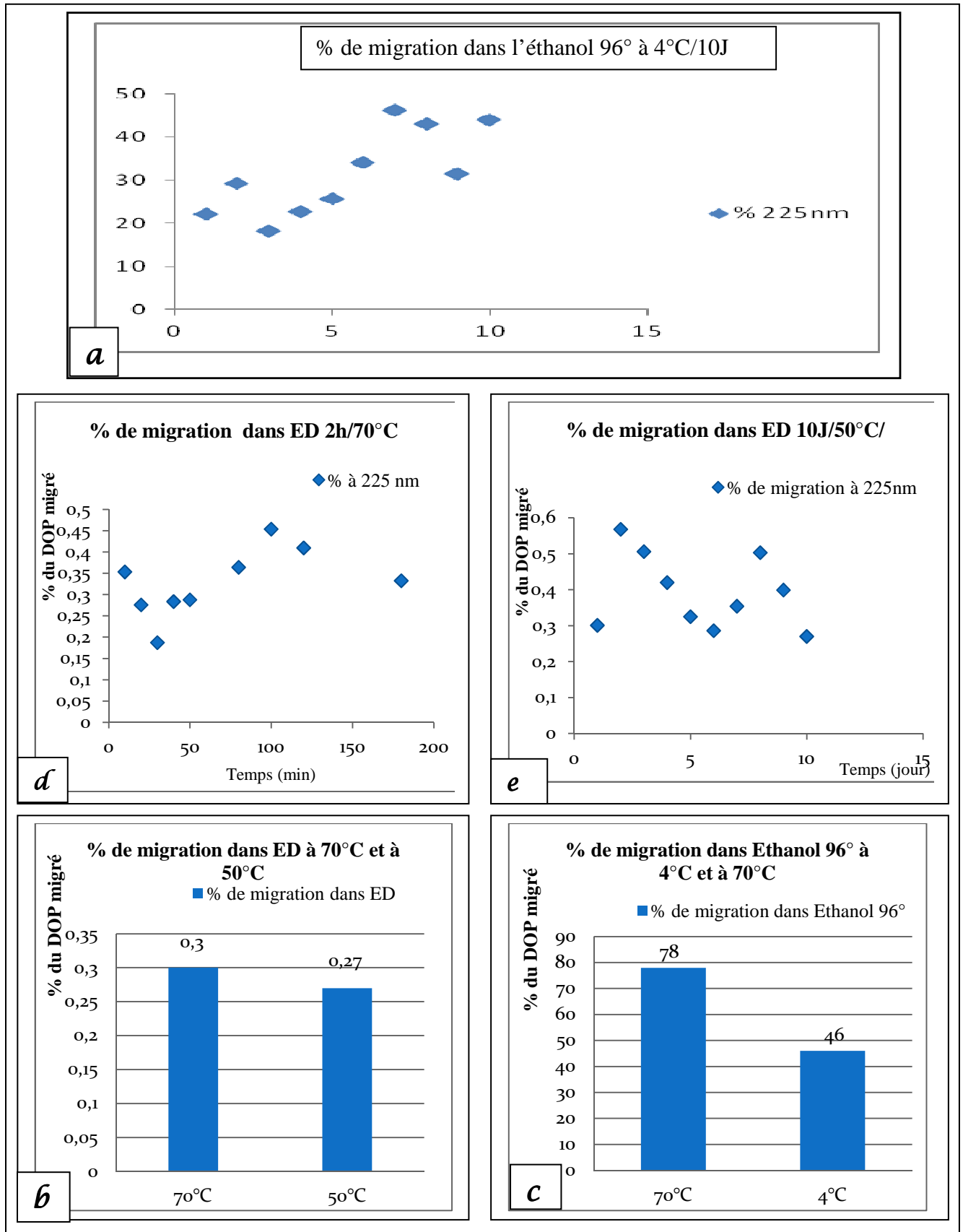


Figure 18 : Variation du taux de migration en fonction de la température

B.II.2.4. Détermination du coefficient de diffusion du DOP par UV.

Le coefficient de diffusion (D) représente la vitesse de migration d'une substance à travers chaque phase (**Lau et Wong** 2000).

Le coefficient de diffusion est calculé à partir de la pente, exprimée par la relation (I) pour $L=0,012$ cm, des courbes représentatives de M_t/M_∞ en fonction de la racine carré du temps exprimée par la relation (II) issue de la résolution de la second loi de Fick dans le cas des temps de contact courts, pour deux cas à savoir ; DOP 30% dans l'éthanol 96°/ 2h 70°C et DOP 30% dans l'éthanol /eau 50/50/2h 70°C.

$$P = \frac{4}{L} \left[\frac{D}{\pi} \right]^{1/2} \quad \text{I}$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{4}{L} \cdot \left[\frac{D \cdot t}{\pi} \right]^{1/2} \quad \text{II}$$

où

- **P** représente la pente de la courbe de M_t/M_∞ en fonction de la racine carrée du temps pour $M_t/M_\infty \leq 0,66$ (**Vergnaud** 1991).
- **M_t** et **M_∞** représente respectivement la quantité de l'espèce migrante à l'instant t et à l'équilibre
- **D** : coefficient de diffusion.
- **L** : épaisseur du film plastique

Le tracer de M_t/M_∞ en fonction \sqrt{T} pour a donné des droites linéaires de coefficients de corrélation > 0.98 , comme le montre la figure 19.

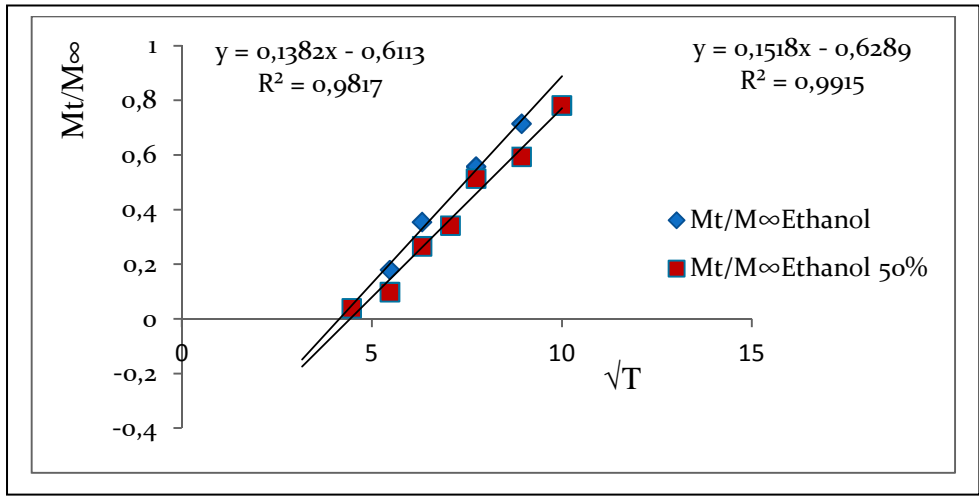


Figure 19 : Variation de M_t/M_∞ du DOP en fonction \sqrt{T} dans l'éthanol 96° et éthanol 50% pendant 2h à 70°C.

Les valeurs des coefficients calculés sont données dans le tableau

Tableau VIIX : Coefficients de diffusion dans l'éthanol 96° et éthanol 50% à 70°C.

	30% DOP/ethanol 96°/2h70°C	30% DOP/ethanol 50% /2h70°C
D	6,452 10-7 cm ² /s	5,397 10-7 cm ² /s

Les résultats montrent que le coefficient de diffusion croit en fonction du milieu en contact, il est plus important dans le milieu éthanol 96° que dans le milieu qui contient de l'eau à 50%.

La migration ainsi que le coefficient de diffusion dépendent du milieu en contact, de la température, de la teneur de l'additif dans la résine ainsi que des propriétés de la résine même, sa pureté, sa structure, son épaisseur ;

L'objectif des études de diffusion est de déterminer le temps pendant le lequel une substance donnée migre totalement dans le milieu de contact. L'utilisation de modèles, de plus en plus variés, mais tous issus des lois de Fick, relatifs aux phénomènes de migration

permettent de prédire les temps T_{∞} pour lequel la masse de l'espèce migrante atteint M_{∞} dans un milieu donné, à une température donnée (dans des conditions bien déterminées).

B.II.2.5. Détermination de la dose limite migrée du DOP

La dose limite spécifique DLS du DOP est déterminée à partir de la masse du DOP qui a migré à l'équilibre ; elle est représentée par M_{∞} et estimée par la plus grande masse du DOP qui a diffusé. Celle-ci est convertie par dm^2 de matériau pour l'évaluer aux teneurs retenues par la réglementation.

Le tableau suivant regroupe les DLS obtenues aux conditions les plus agressives à savoir 2h/70°C.

Le passage à la dose DLS par kg de denrée alimentaire est déterminée en multipliant par un facteur 6 la DLS déterminée par dm^2 (JO 15.1.2011) ;

Tableau VIII X : Doses limites spécifiques du DOP dans les différents milieux à 70°C

DLS	milieu	Ethanol96%	Ethanol/eau 50/50
	mg/dm²	334.775	103.05
	mg/kg denrée	2008.65	618.3

Nos résultats montrent que les doses limites spécifiques du DOP obtenues, sont largement dépassées dans l'éthanol et l'éthanol 50 %. Ceci est dû à la grande affinité de DOP pour les simulants des matières grasses. Le DEHP est interdit dans les matériaux en contact avec des denrées alimentaires grasses (**règlement 2011**).

B.II.3. Etude cinétique de la migration du DOP par la spectroscopie IRTF/ATR appliquée aux films.

La migration du DOP par FTIR a été suivie en se basant sur la variation de l'aire de la bande caractéristique la plus intense du DOP, 1720 à cm^{-1} correspondant au groupement carbonyle C=O.

B.II.3.1. Effet de la concentration en DOP

La concentration en plastifiant dans les films en PVC a un effet important sur le matériau ainsi que sur le phénomène de migration. Les films à 1%, 15% et 30% DOP ont été analysés par FTIR/ATR avant et après migration.

L'évolution du taux de migration observée dans l'éthanol 96% à 70°C pendant 2h en contact de films contenant 1%, 15% et 30% de DOP est croissante en fonction de la concentration du plastifiant comme le montre la figure 20; Le taux de migration en fonction de la concentration atteint à l'équilibre environ 86% dans les films à 30%, 20% pour ceux à 15% et enfin 0% pour les films à 1% .

Ces résultats concordent avec la littérature qui mentionne que la migration augmente avec la quantité de plastifiant dans le matériau (Fayolle, 2005 ; Gregory, 2009).

- **30% DOP**

L'analyse par FTIR des films à 30% DOP a montré une migration intense et rapide, plus de 30% du DOP a été migré dans les premières 10 mn de contact et plus de la moitié, 63% après 2H de contact, comme l'illustre bien la figure 20.

Ces résultats concordent avec la littérature qui mentionne que la migration du DOP est fonction de degré de plastification des films, en effet l'addition de plastifiant diminue la T_g du polymère, elle fait passer le PVC de l'état vitreux à l'état caoutchoutique qui se caractérise par une mobilité moléculaire élevée, ce qui facilite la migration du DOP (Gregory, 2009).

- **15% DOP**

Le taux de migration dans les films à 15% est trois (3) fois inférieure à celui observé dans les films à 30% DOP, en effet, nous avons observé un taux de 10 % dans les 10 mn premières de contact et un taux qui ne dépasse pas 20% après 2H de contact. (Figure 20).

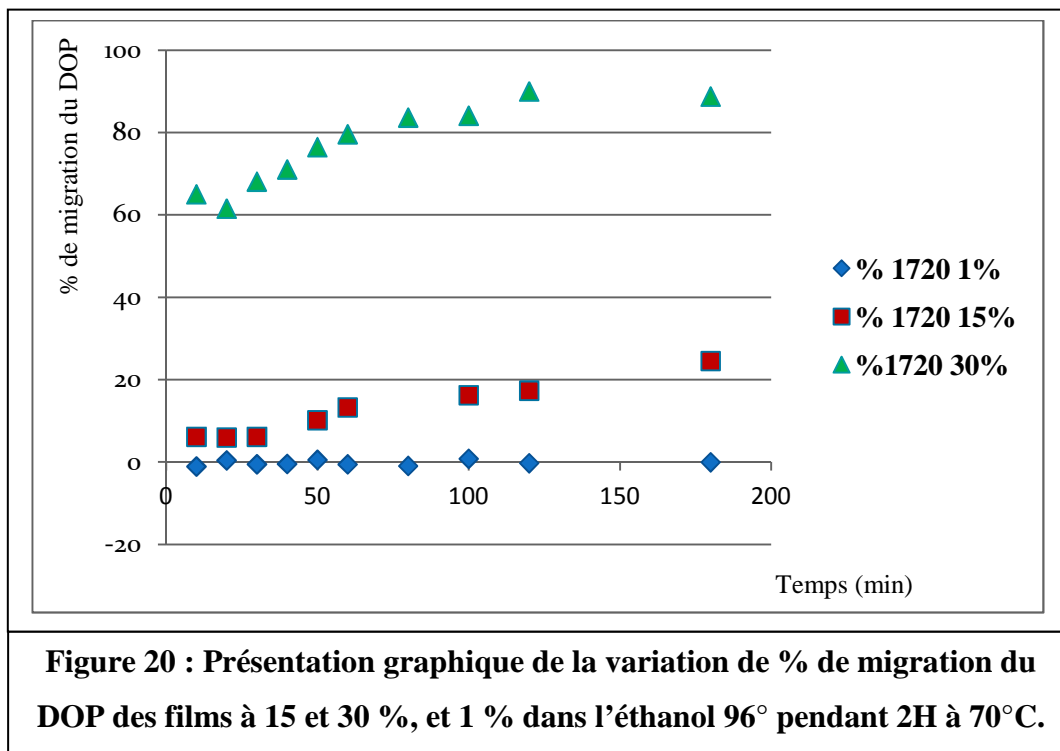
Ces faibles taux de migration s'expliquent par l'état semi cristallin des films, qui se caractérise par une rigidité un peu élevée et une phase amorphe réduite donc une faible mobilité moléculaire par conséquent diminution de taux de la migration. (Fayolle, 2005).

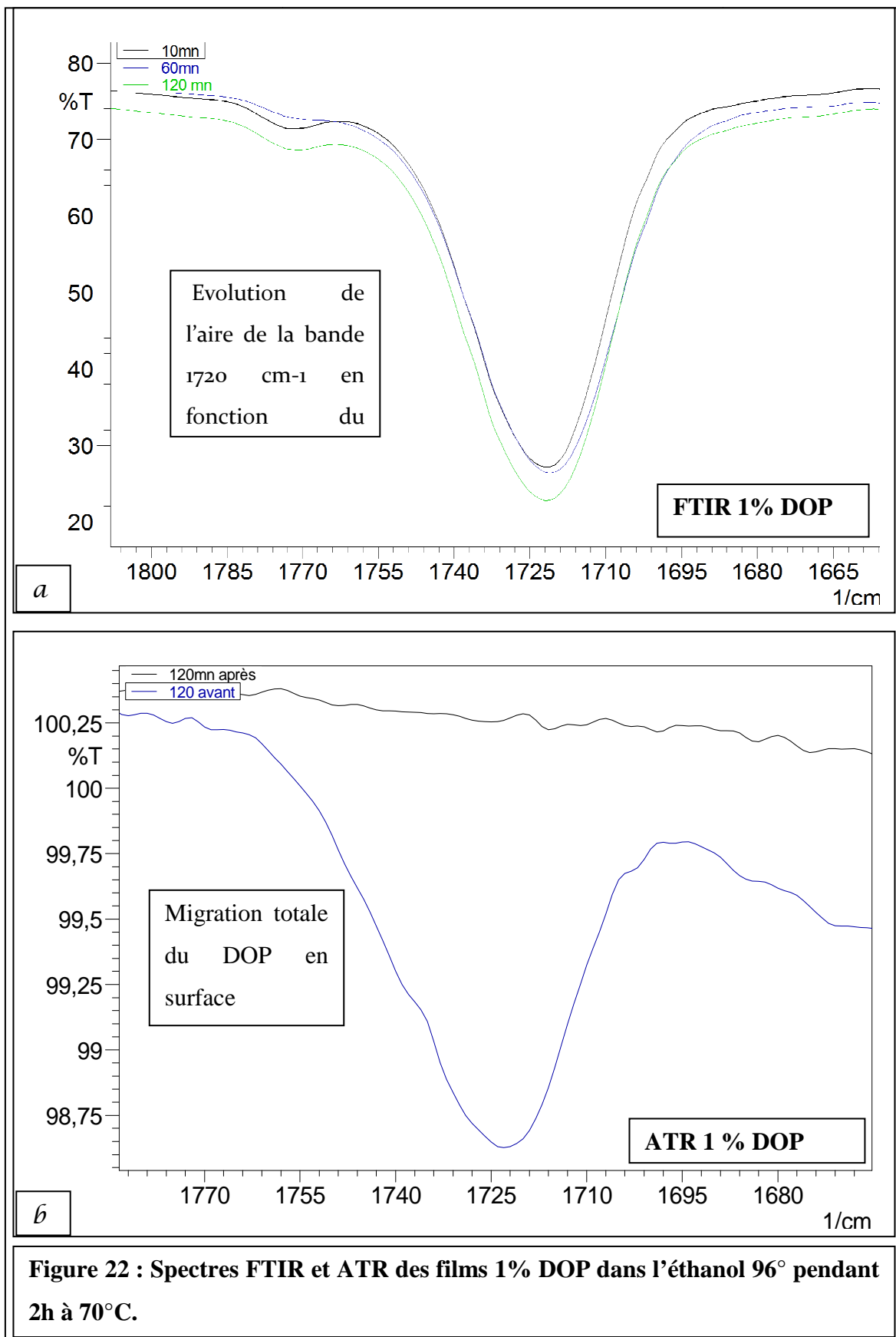
- **1% DOP**

Les pourcentages de migration du DOP obtenus dans les films PVC 1% DOP imprégnés dans l'éthanol 96° pendant 2H à 70°C sont presque nuls (figure 20).

Les spectres FTIR des films PVC 1% ont montré une légère augmentation de l'aire de la bande 1720 cm^{-1} , figure (22 a) due à la pénétration du solvant à l'intérieur. L'ATR par contre, nous a permis d'observer une migration totale en surface des films, tout le DOP en surface a migré, figure (22 b). Donc même si la cristallinité des films empêche la migration de l'intérieur des films (FTIR), le DOP de la surface migre dans les solutions.

Par ailleurs, une apparition de poches de gonflement a été observée sur les films à 1% ; ce gonflement pourrait être attribué à une pénétration de molécules du solvant à l'intérieur du polymère (éthanol) qui restent piégées à l'intérieur de la matrice et provoque ainsi une modification des propriétés du matériau (confirmé par l'apparition d'une bande aux environs de 3600cm^{-1} attribuée à la fonction O-H (figure 23) ; Fayolle (2005) et Gregory (2009), ont indiqué que la première conséquence de la pénétration du solvant dans le polymère est le gonflement.





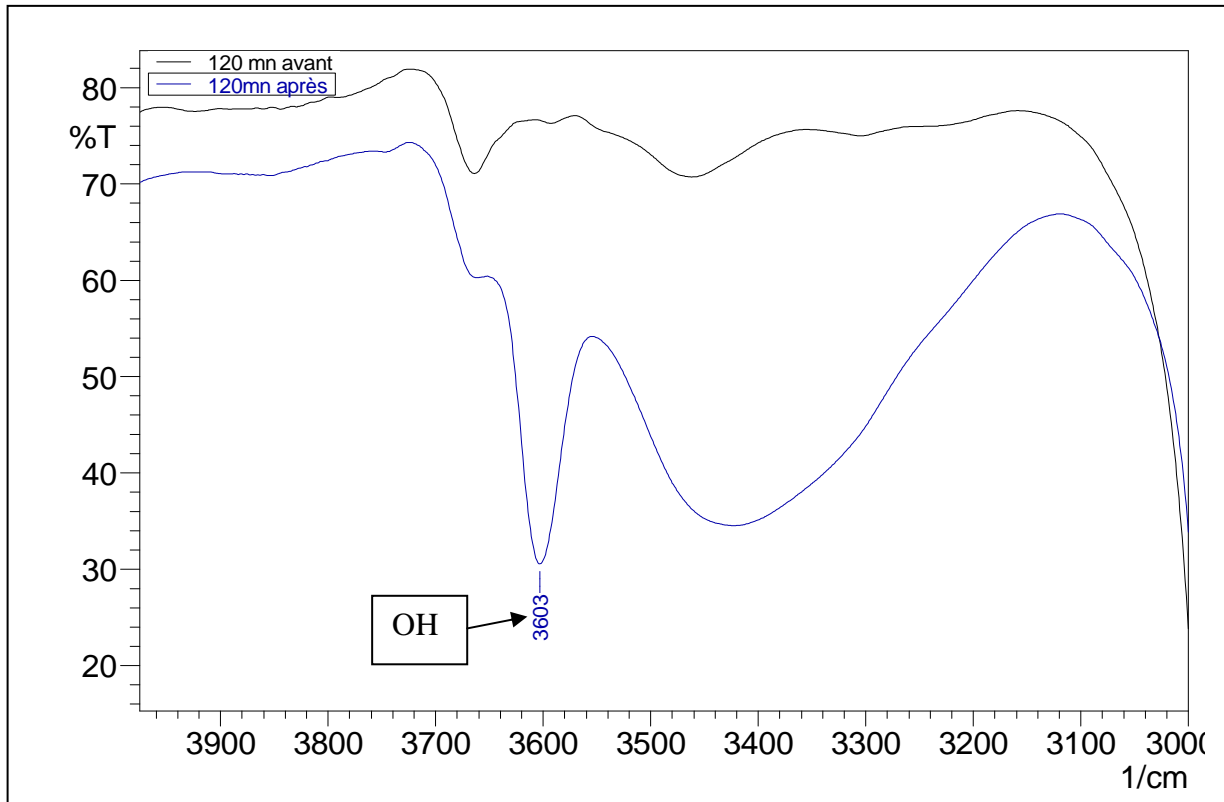


Figure 23 : Zoom de la zone spectrale de groupement OH de l'éthanol, dans 1% DOP avant et après migration par FTIR.

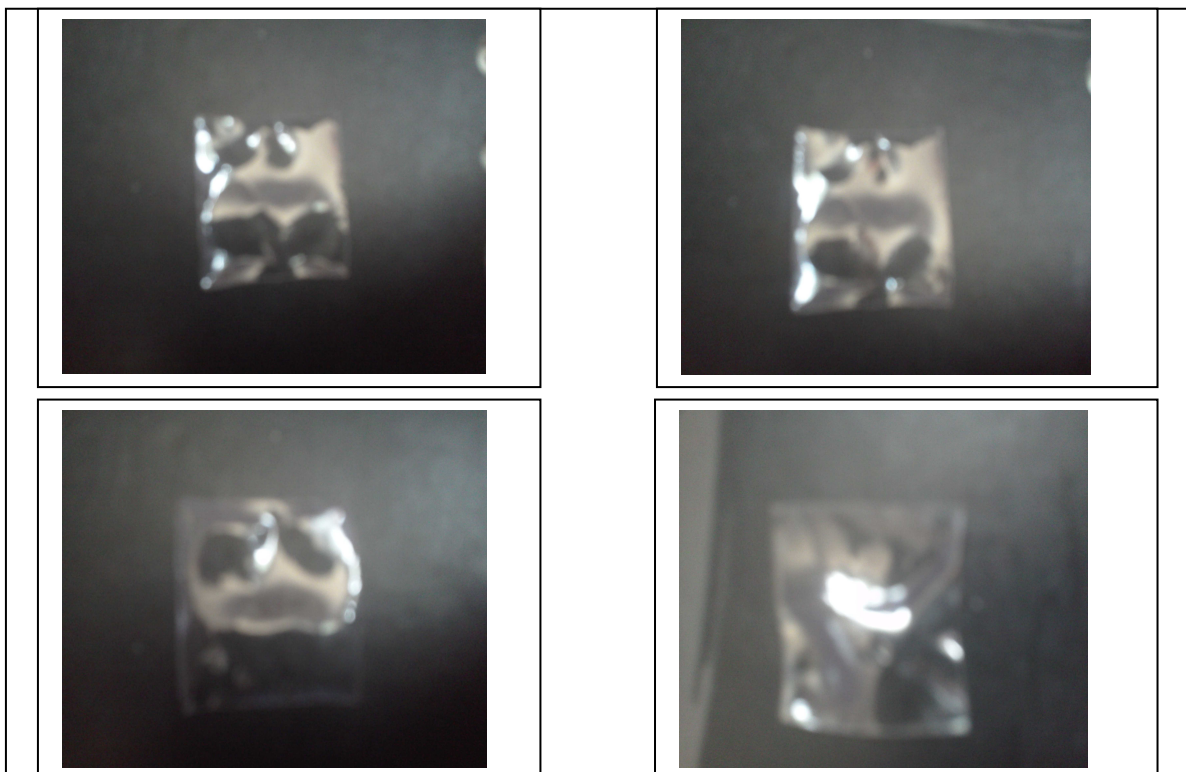


Figure 24 : Gonflement des films 1% DOP après le test de migration, 2H dans éthanol96° à 70°C.

B.II.3.2. Effets du milieu simulateur

Pour étudier l'effet du milieu sur la migration du DOP, nous avons réalisé l'essai de 2H à 70°C avec les films PVC 30% DOP dans ; éthanol, éthanol 50% et dans l'eau distillée (ED).

La diffusion du DOP est influencée par le milieu en contact ; en effet, les résultats des taux de migration obtenus montrent une diminution lorsque le milieu contient une proportion d'eau ;

- **Ethanol 96°**

Les résultats de la migration du DOP dans éthanol 96° sont illustrés par la figure 25, nous observons une migration croissante en fonction du temps jusqu'à atteindre 88% à la fin des essais. Ces résultats sont dus à l'effet additionné du solvant et de la température, en effet l'éthanol a une grande affinité pour le DOP d'un autre côté la température (70°C) favorise et accélère le processus de migration.

- **Ethanol 50%**

Les pourcentages de migration dans le milieu éthanol 50% diminuent de 20% environ par rapport à ceux observés dans éthanol 96°, en effet nous avons enregistré un taux de 70% dans l'éthanol 50% , (figure 25). Ces résultats sont dus à la réprécipitation du DOP dans le milieu qui contient 50% d'eau, et diminution du pouvoir de solubilité de l'éthanol.

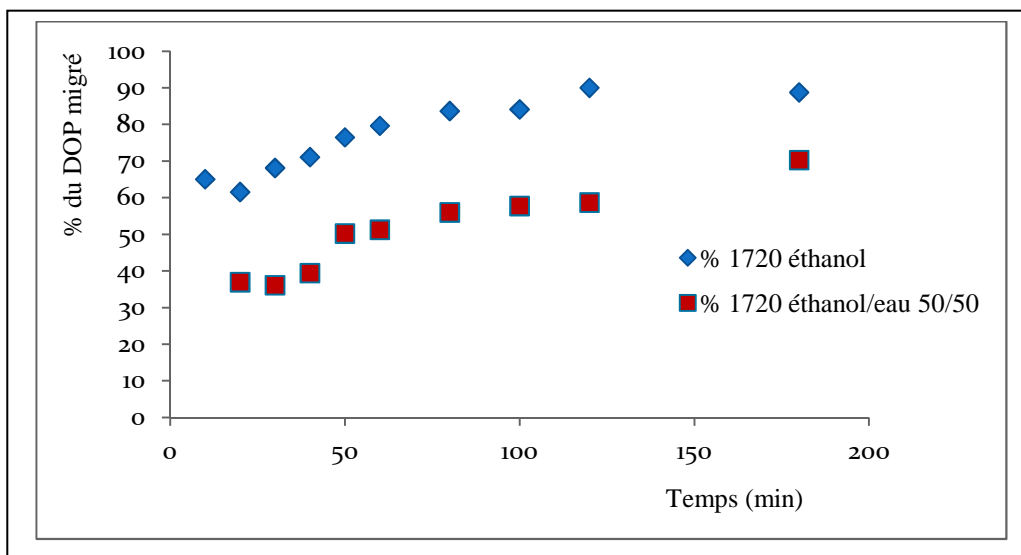


Figure 25 : Variation de la migration du DOP dans l'éthanol et éthanol 50 % pendant 2H à 70°C.

• **Eau distillée**

Dans le cas de l'eau, l'étude de la migration du DOP à partir de film à 30% conservés à 70°C pendant 2h, par FTIR a donné des valeurs qui restent négligeables ; l'eau reste un milieu pour lequel le DOP ne présente pas d'affinité et où la migration est négligeable (figure 26). Cependant la cinétique de migration a été perturbée par la pénétration de l'eau à l'intérieur des films ce qui s'est traduit par les valeurs négatives. Par ailleurs, l'ATR nous a permis d'observer une migration presque totale du DOP de la surface des films à la fin des essais, comme l'illustre la figure 27.

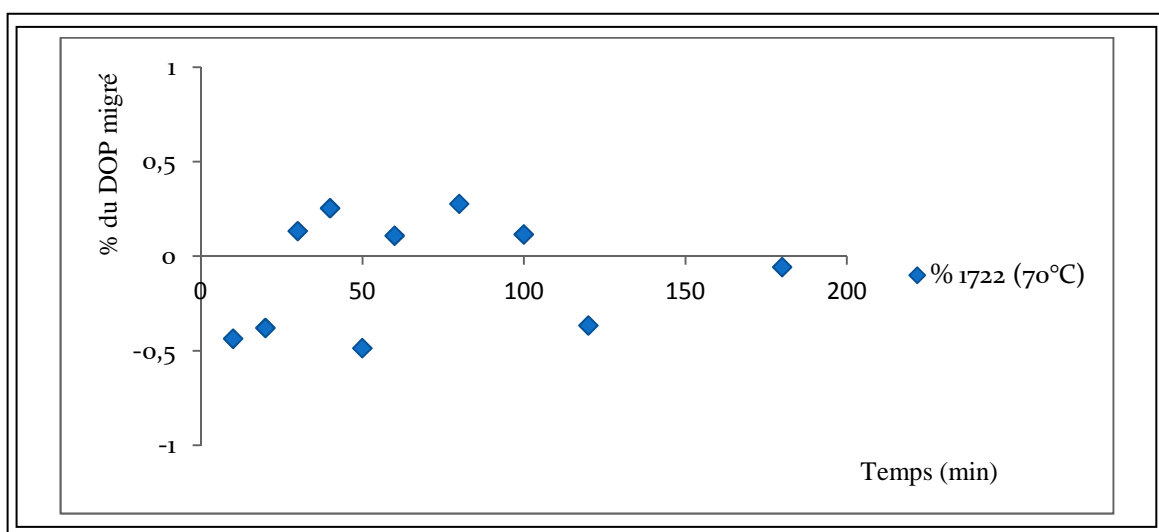


Figure 26 : Présentation graphique des % de migration du DOP dans l'eau distillée pendant 2H à 70°C.

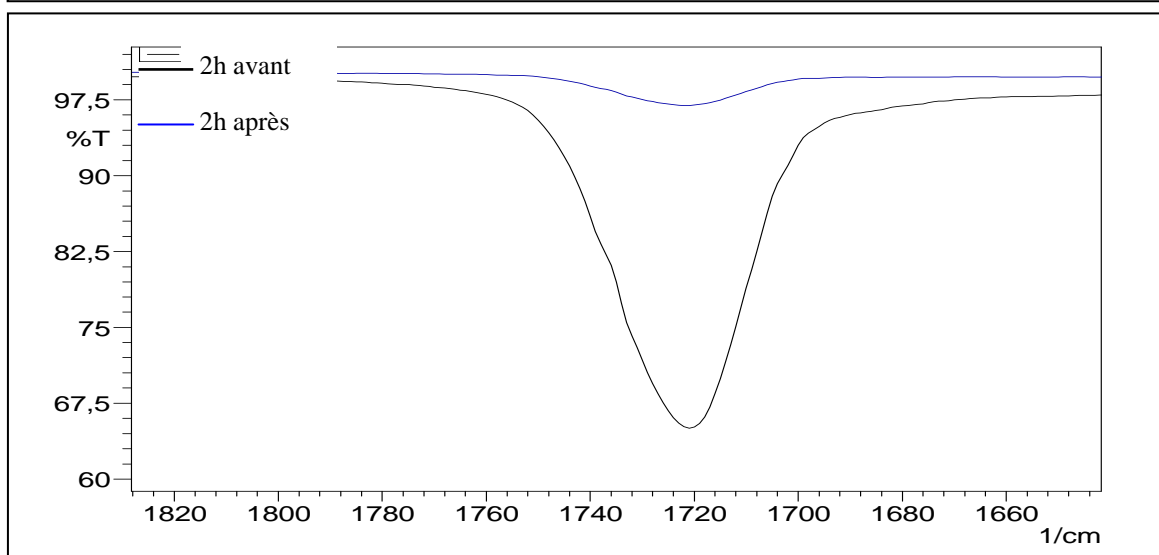


Figure 27 : Spectres ATR d'un film 30% DOP avant et après migration dans l'eau distillée

B.II.3.3. Effet de la température

Le phénomène de migration est thermo-dépendant, en effet la température contrôle l’aspect et l’état du polymère, les températures élevées activent la migration en augmentant d’avantage la souplesse et la mobilité moléculaire facilitant ainsi la migration, a contrario, les basses températures inhibent ou ralentissent la migration en augmentant d’avantage la rigidité du polymère diminuant de la mobilité moléculaire.

Les résultats de la variation des taux de migration en fonction de la température sont illustrés par la figure 30, la figure 30 montre que la migration à 4°C ne dépasse pas 20 % alors qu’il atteint le double (40%) à 50°C.

Pour mieux visualiser l’influence de la température sur la migration du DOP, nous avons regroupé les pourcentages de migration obtenus à 4, 50 et à 70°C dans la figure 30b. On observe clairement que le taux de migration augmente avec la température.

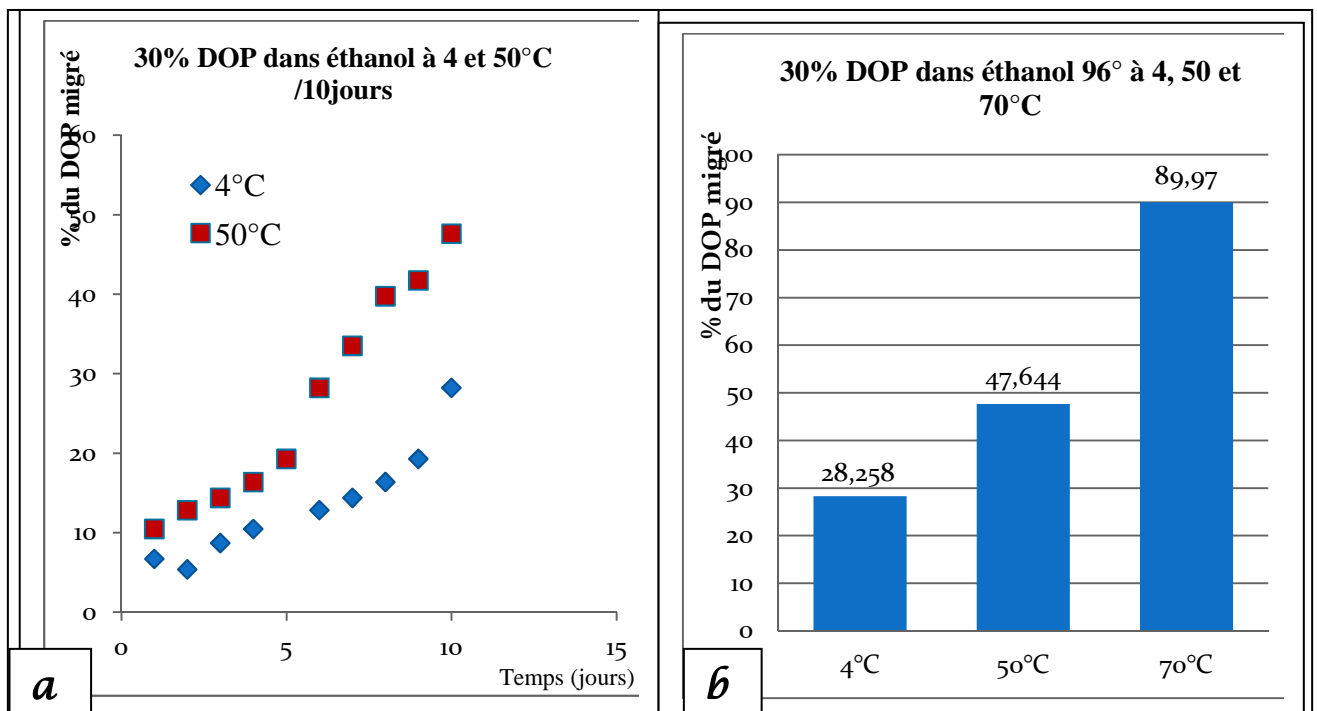


Figure 28 : Variation des taux de migration du DOP dans l’éthanol 96° à 4, 50 et 70 °C.

B.II.4. Etude comparative entre les deux techniques UV et FTIR

L'étude cinétique de la migration du DOP dans le cas de film PVC plastifié dans l'éthanol (figure 31 c), a donné des résultats proches par les deux FTIR et UV visible du fait de degré de plastification du matériau qui permet une diffusion importante et aisée du DOP ainsi qu'une évaporation totale du solvant dans le matériau par chauffage ;

Dans le cas de films rigides ou semi rigide, à 1% et 15% DOP respectivement, les taux de migration observés par les deux techniques FTIR et UV sont différents (figure 31 a et b) ; nous retrouvons 20% pour le PVC à 15% DOP et 0 % pour celui à 1% par FTIR alors que l'UV visible donne 48 % pour PVC à 15% DOP et 20% pour celui à 1%. Les résultats donnés par FTIR concordent parfaitement avec la littérature qui rapporte des taux de migration faibles ou nuls aux basses concentrations en DOP (Pfab 1973; Yu et Selvadurai 2005).

Par ailleurs l'ATR a permis de constater la diffusion presque totale du DOP en surface des films rigides et semi rigide, ce qui confirme que la migration du DOP, même si elle est considérée négligeable, elle n'est pas complètement nulle.

La divergence des résultats trouvés par UV pourrait être due à la contamination des solutions, en effet les phtalates sont des contaminants ubiquitaires de l'environnement. INRS (2005) a mentionné que l'une des contraintes majeures d'analyses des phtalates réside dans le fait que sont des contaminants ubiquitaires difficile voire impossible de les éliminer pendant la manipulation. Les erreurs de manipulation et l'évaporation de petites quantités des solutions pendant la conservation peut augmenter la concentration du DOP dans le milieu.

L'étude de l'influence du milieu sur la migration du DOP, réalisée sur des films en PVC à 30% DOP dans l'éthanol pur pendant 2h, 70°C, a donné des taux 86% par FTIR et 78% par UV visible (figure 31f); cette différence peut être attribuée à la présence d'une faible quantité d'eau dans le milieu qui provoque une reprecipitation du DOP ; cette différence est beaucoup plus prononcée dans le milieu éthanol /eau ou la proportion d'eau est de 50% (figure 31 e) ; on retrouve des taux de migration d'environ 20% par UV alors qu'il atteint le 70% par FTIR.

Donc la spectrométrie UV ne peut pas être appliquée au suivi de la cinétique de migration du DOP dans le milieu éthanol/eau en raison de la reprecipitation du DOP dans ce milieu, les solutions présentent une opalescence qui perturbe l'analyse par UV visible.

Dans le cas de l'eau, (figure 31 d), le suivi de la migration du DOP par FTIR a donné des valeurs plus ou moins perturbées, provoqués peut être par la pénétration de l'eau dans la résine mais elles restent négligeables ; l'ATR nous a permis de constater une migration du DOP qui se retrouve en surface, mais le taux reste faible. L'UV a confirmé aussi ces résultats ; Ces taux faibles sont attribués à la mauvaise solubilité de DOP dans l'eau.

Les valeurs trouvées dans le cas de l'eau, par les deux techniques ne sont pas significatives du fait de leur manque de sensibilité ($> 10 \mu\text{g}/\text{ml}$).

Conclusion

La technique UV visible est une technique simple qui permet de caractériser le DOP et de suivre sa migration à partir du PVC dans certains milieux ou se dernier présente une bonne solubilité, mais elle ne peut s'appliquée au suivi de migration du DOP dans les milieux aqueux en raison de la réprécipitation du DOP dans ces milieux et le manque de sensibilité dans le cas de l'eau où la migration de DOP est en traces.

La spectrométrie FTIR/ATR est certes une technique simple et accessible qui permet une très bonne caractérisation du matériau, mais reste limitée par la pénétration des solvants aqueux à l'intérieur des films, ce qui augmente les surfaces et perturbe la cinétique de migration. ATR a un avantage de donner des pics fins et bien séparés dans le cas des grandes concentrations en DOP et permet de suivre la migration en surface des films.

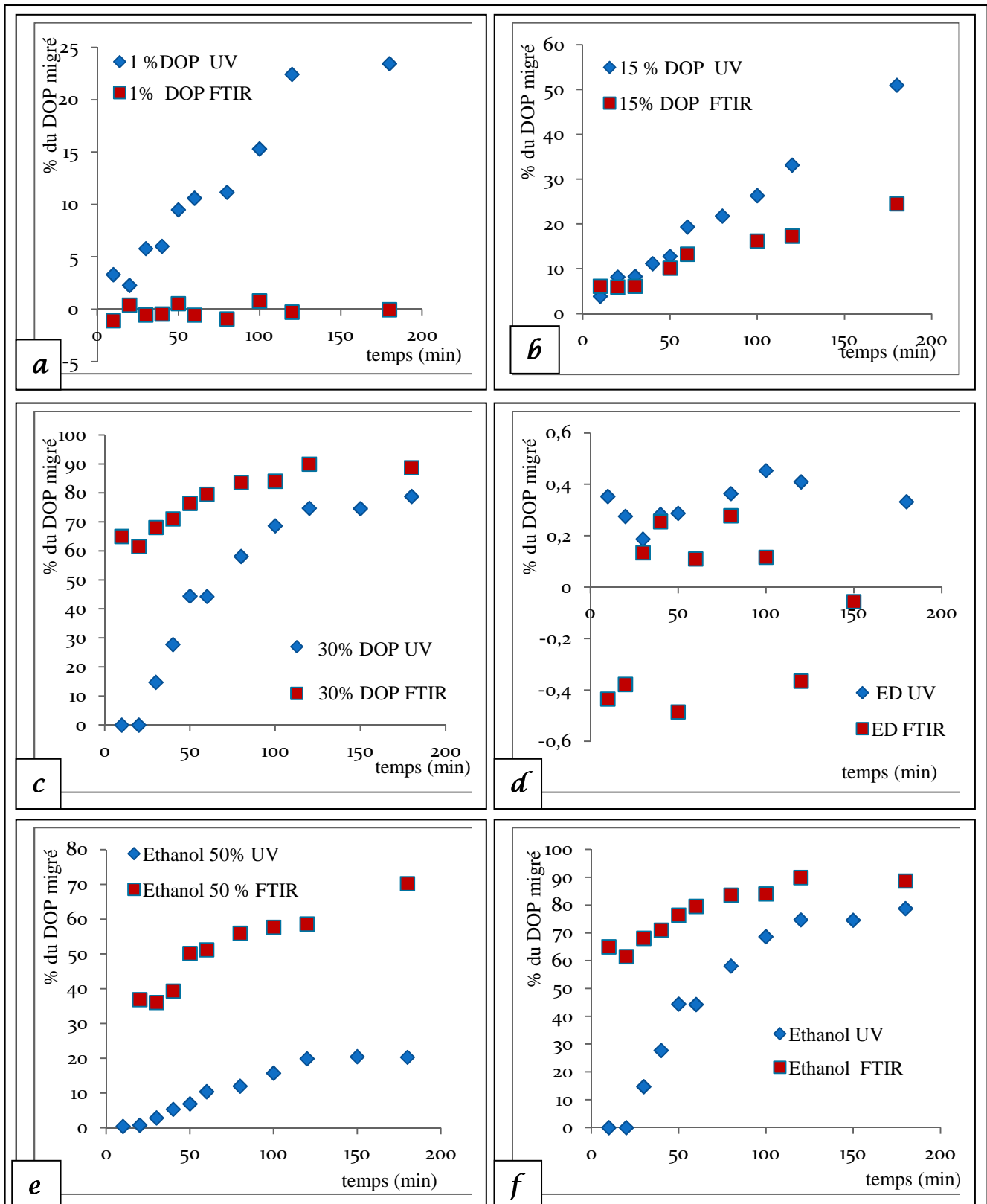


Figure 29 : Variation de % du DOP migré mesuré par les deux techniques, spectroscopie UV et FTIR, dans les différentes conditions opératoires adoptées.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

Notre travail a eu pour objectif d'évaluer les effets à faible dose de DEHP sur le système de reproduction chez le rat Wistar exposé *in utero*, et de mettre en place une méthodologie analytique simple et fiable pour le suivi de la migration du DEHP des films en PVC à différentes concentration en plastifiant, vers quelques milieux simulants de denrées alimentaires.

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié l'effet d'une exposition *in utero* à une faible dose de DEHP (4mg/kg/j) sur l'appareil reproducteur de rat mâle.

Dans nos conditions expérimentales, nos résultats soulignent la vulnérabilité élevée pendant la période utérine et confirment les effets à faible dose de DEHP sur le développement et sur le système de reproduction, en effet nous avons observé une défaillance hormonale sexuelle et une forte altération de la distance anogénitale DAG et du poids testiculaire.

Ces résultats fournissent donc une nouvelle preuve sur les effets à faible doses de DEHP et remettent en cause la limite sans effet (DSE ou NOAEL) fixée par la législation.

Mais malheureusement, malgré le fait que nous soyons exposés tout le long de notre vie à **faibles doses**, les toxicologues de l'industrie continuent à faire les études à des doses supérieures à la NOAEL, et les agences de réglementation continue de baser leurs évaluations sur les études de l'industrie !

Il est maintenant évident que les perturbateurs endocriniens, le DEHP en particulier, ont des effets: reprotoxiques, auxquels se rajoutent d'autres notions telles que : les faibles doses (doses équivalentes aux taux d'exposition humaine), la fenêtre et la durée d'exposition (*in utero*, postnatale ou tout au long de la vie.) et le mode d'exposition (cutanée, orale, inhalation..). Tout ceci rend le sujet encore plus complexe et implique d'adopter une nouvelle démarche d'évaluation des risques liés aux produits chimiques particulièrement les perturbateurs endocriniens.

La deuxième partie de ce travail porte sur la contribution des techniques spectrophotométriques à la caractérisation du DEHP dans le film en PVC et au suivi de sa migration vers quelques milieux simulateurs de denrées alimentaires.

Les deux techniques spectrométrique à savoir, l'UV et l'FTIR ont permis de caractériser de DEHP dans les solutions et dans le film plastique.

Les deux techniques ont été appliquées au suivi des essais de migration du DOP menés à trois températures (4, 50 et 70°C) sur des films en PVC à 1%, 15% et 30% en DOP dans les milieux éthanol pur, éthanol 50% et eau distillée.

Elles ont pu mettre en évidence l'influence des paramètres physico-chimiques (température, nature du milieu et concentration en DOP) sur le phénomène de migration ;

Les résultats obtenus par les deux techniques sont comparables dans certains cas mais quelques écarts ont été notés dans d'autres ;

La spectrométrie FTIR s'applique directement sur le matériau, ce qui est un grand avantage mais le moindre changement dans ses caractéristiques lors de l'étude altère l'analyse (cas du PVC rigide);

La spectrométrie dans l'UV s'applique sur les solutions, l'effet hydrophobe du DOP permet une réprécipitation de ce dernier dans certains milieux aqueux, ce qui entraîne une perturbation des résultats de migration. De plus, le taux de migration du DOP dans l'eau n'a pas été évalué du fait du manque de sensibilité de la méthode.

Les deux techniques spectrométriques proposées pour l'analyse du DOP et le suivi de sa migration ont donné des résultats satisfaisants avec certaines limites d'utilisation.

Perspectives

Pour aller plus loin dans le sujet, il serait très intéressant de :

- ✚ Etudier l'effet cocktail mimant les conditions environnementales puisque nous sommes exposés à plusieurs phtalates en même temps ;
- ✚ Caractériser les dangers de DEHP pour l'environnement et les écosystèmes ;
- ✚ Rechercher le DEHP dans les aliments et boissons (eaux en bouteille) ;
- ✚ Estimer le niveau d'exposition du consommateur Algérien à travers le dosage des métabolites de DEHP dans les urines ;
- ✚ Développer les méthodes immunologiques, pour le suivi de la migration dans l'eau, comme ELISA « Enzyme Linked Immunosorbent Assay » (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée) qui est une méthode simple, sensible et surtout très sélective et c'est une bonne alternative économique, au lieu d'aller vers HPLC et CGMS qui restent inaccessibles.

Références bibliographiques

- **Adami HO; Bergstrom R; Mohner M; Zatonski et al.** (1994). Testicular cancer in nine northern European countries. *Int. J. Cancer*, **59**(1), 33-38.
- **Adamopoulos DA ; Pappa A ; Nicopoulou S ; Andreou E et al.** (1996) Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the greater Athens area during the period 1977-1993. *Hum. Reprod.*, **11**(9), 1936-1941.
- **Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (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.
- **Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES).** (2012). Avis relatif à l'élaboration d'une valeur toxicologique de référence chronique par ingestion pour le phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP)
- **Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES).** (2011). Valeurs limites d'exposition en milieu Professionnel, Évaluation des effets sur la santé et des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail pour le di (2-éthylhexyl) phtalate (DEHP). *Rapport d'expertise collective*.
- **Agence nationale de sécurité sanitaire, alimentation environnement travail (ANSES).** (2013). Perturbateurs Endocriniens Synthèse et étude des auditions Rapport d'appui scientifique et technique.
- **Agency for Toxic substances and Disease Registry (ATSDR).** (2002). Toxicological Profile for Di (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.pdf>)
- **Akingbemi B; Youker R; Sottas C; KATZ E.** (2001). Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Biol Reprod* 2001,65: 1252-1259
- **Alam M; Ohsako S; Matsuwaki T; Zhu X; Tsunekawa N; Kanai Y; Sone H; Tohyama C; Kurohmaru M.** (2010). Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: a possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reproduction* 2010;139, 427-437
- **Almeras C; Cancan Y; Gereec V; Millet M.** (2010). Les phtalates. Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP) Paris.

- **Anderson J M; Andrade; Simone W; Grande; Chris E; Talsness; Konstanze G; Andrea G; Anja S; Chahoud I.** (2006): A dose response study following *in utero* and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate: Effects on androgenic status, developmental landmarks and testicular histology in male offspring rats. *Toxicology* 225 (2006) 64–74.
- **Auger J.** (1997). Evolution de la fertilité de l'homme au cours des 20 dernières années. *Contracept. Fertil. Sex.*, 25(6), 524-529.
- **Auharek S; Franca L; McKinnell C; Jobling M; Scott S; Sharpe R.** (2010). Prenatal plus postnatal exposure to Di(n-Butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final sertoli cell number in the rat. *Endocrinology* 2010; 151, 2868-2875.
- **Bach Campa C.** (2011). 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 migrants. Thèse de doctorat institut national polytechnique de Lorraine. Paris.
- **Bergé A .** (2012). Identification des sources d'alkylphénols et de phtalates en milieu urbain. Comparaison des rejets à dominante urbaine (domestique) par rapport à des rejets purement industriels. thèse de doctorat. Paris-Est. pg 45.
- **Biscardi D; Monarca S; De Fusco R; Senatore F; Poli P; Buschini A.** (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. *Sci Total Environ* 2003;302:101–8.
- **Camel V et Rega B.** (2012). Quels outils analytiques pour la détermination des dangers chimiques liés aux matériaux au contact des denrées alimentaires ? *AgroParisTech-UMR 1145 Ingénierie, Procédés, Aliments.*
- **Carlsen E; Giwrcman A; Keiding N; Skakkebaek NE.** (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.*, 305, 609-613.
- **Casajuana N; Lacorte S.** (2003). Presence and release of phthalic esters and other endocrine disrupting compounds in drinking water. *Chromatographia* 2003; 57:649–55.
- **Christiansen S ; Boberg J; Axelstad M; Dalgaard M; Vinggaard AM; Metzdorff SB; Hass U.** (2010). Low-dose perinatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate induces anti-androgenic effects in male rats. *Reprod Toxicol.* 2010 Sep;30(2):313-21.

- **Conseil Européen des Plastifiants et Intermédiaires (ecpi.org). 2012.** Informations sur les phtalates. <http://www.ecpi.org/>
- **Consumer Product Safety Commission (CPSC) (2010).** Overview of dialkyl orthophthalates toxicity. 2010 (<http://www.cpsc.gov/about/cpsia/phthalover.pdf>)
- **Creasy D; Foster PMD.** (2002). Male *Reproductive System*. In: *Handbook of Toxicologic Pathology*. San Diego: Haschek W. 829-887.
- **Culty M.** (2009). Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009; 87, 1-26
- **David RM; Moore MR; FINNEYD C; GUEST D.** (2000). Chronic toxicity of di(2 ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicol Sci* 2000, 55: 433-443
- **Delbes G; Levacher C ; Habert R.** (2005). Le testicule foetal est-il en danger? *Med. Sci. (Paris)*, 21(12), 1083-1088.
- **Delbes G; Levacher C; Habert R.** (2006). Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* 2006;132:527–38.
- **Diamanti-Kandarakis E ; Bourguignon JP ; Giudice LC ; Hauser R ; Prins GS.** (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 30: 293-342
- **Europa.eu.** (2011). L'actualité de l'UE. http://europa.eu/news/index_fr.htm
- **European Chemicals Bureau (ECB).** <http://ecb.jrc.it>. (2008). European Union Risk Assessment Report, bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP).
- **European Commission (EC).** (2005). 'Integrated pollution prevention and control. Draft Reference Document on Best Available Techniques in the Production of Polymers. [www. ec.europa.eu/index_fr.htm](http://www.ec.europa.eu/index_fr.htm)
- **European Commission (EC).** (2008). The safety of medical devices containing DEHP-plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk. SCENIHR. http://ec.europa.eu/health/ph_risk/risk_en.htm
- **European food safety authority (EFSA).** (2005). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. *The EFSA Journal* (2005) 243, 1-20 (<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/243.pdf>)
- **European food safety authority (EFSA).** (2012). Les effets des faibles doses en toxicologie et en évaluation des risques. *17e colloque scientifique de l'EFSA*.

- **European food safety authority (EFSA).** (2013) .avis scientifique sur perturbateurs endocriniens ; notes aux rédacteurs. <http://www.efsa.europa.eu/fr/>
- **Fayolle B.** (2005). Vieillesse physique des matériaux polymères, in *Techniques de l'ingénieur. am3150.*
- **Feigenbaum A ; Riquet A ; Scholler D.** (1993). Safety and quality of foodstuffs in contact with plastic materials: A structural approach. *Journal of Chemical Education* 70(11), 883-null.
- **Ferrara D; Hallmark N; Scott H; Brown R; McKinnell C; Mahood I; Sharpe R.** (2006). Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology* 2006; 147,
- **Fick A.** (1855). On liquid diffusion. *Philosophical Magazine, Series 4, 1855.* 10(63).
- **Fisher J; Macpherson S; Marchetti S; Sharpe R.** (2003). Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 2003; 18, 1383-1394.
- **Gillet G.** (2008). Prévion de la conformité des matériaux d'emballage par intégration par intégration des méthodes de déformation et de modélisation du coefficient de partage. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. 9.
- **Gray J ; Ostby J ; VEERAMACHANENI D.** (2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci* 2000, 58 : 350-365
- **Gray J; Barlow N; Ostby J; Furr J.** (2009). Transgenerational effects of di (2-ethylhexyl) phthalate in the male crl : cd (sd) rat : added value of assessing multiple offspring per litter. *Toxicol Sci* 2009, 110 : 411-425
- **Gray L; Laskey J; Ostby J.** (2006). Chronic di-n-butyl phthalate exposure in rats reduces fertility and alters ovarian function during pregnancy in female Long Evans hooded rats. *Toxicol Sci* 2006;93, 189-195
- **Grégory M.** (2009). Absorption de l'eau par les polymères. Thèse de doctorat, Université de Savoie ; Spécialité : Matériaux polymères et composites.pg 25.
- **Haschek W; Rousseaux CG.** (1998). Male *Reproductive System.* In: Fundamentals of Toxicologic Pathology. San Diego: Haschek WM, Rousseaux CG. 443-483.1
- **Heinemeyera G; Sommerfelda C; Springera A; Heilanda A; Lindtnera A.** (2013). Estimation of dietary intake of bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) by

consumption of food in the German population; *International Journal of Hygiene and Environmental Health*.

- **Heudorf U; Mersch-Sundermann V; Angerer J.** (2007). Phthalates: Toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (210).
- **Higuchi T ; Palmer J ; Gray j ; VEERAMACHANENI D.** (2003). Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent, or postpubertal exposure. *Toxicol Sci* 2003, 72 : 301-313.
- **Hruska Z ; Guesnet P; Couchoud J .** (2007). Poly (chlorure de vinyle) in « Matières thermoplastiques : *Monographies*. 42147. www.techniques-ingenieur.fr.
- **IARC MONOGRAPHS.** (2012). DI (2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE.
- **INERIS.** (2005). Di-(2-éthylhexyl) phtalate (DEHP). Données technico-économiques sur les substances chimiques en France. 15-16.
- **INERIS.** (2006). Chlorure de vinyle. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France.14.
- **Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS).** (2010). Di(2-Ethylhexyl)Phtalate (DEHP) : Stratégie de réduction de la concentration dans les cours d'eau. *Rapport d'étude N° DRC-10-102861-02415A*.
- **Institut National de la santé et de la recherche médicale (INSERM)** 2011: Reproduction et environnement, www.inserm.fr/content/.../Synthese_Reproduction_environnement.pd.
- **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).** (2004). Fiche toxicologique n°FT161. Phtalate de bis(2-ethylhexyle). <http://www.inrs.fr>
- **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).** (2006). Fiche INRS ED5010. Le point des connaissances sur les phtalates. <http://www.inrs.fr>.
- **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).** (2010). Fiche demeter n° DEM 015. Phtalate de bis (2-ethylhexyle) DEHP. Synthèse des niveaux de preuve de danger par période d'exposition.
- **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).** (2012). Produits chimiques cancérogènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction, classification réglementaire.
- **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).** (2013). Phtalate de bis(2-ethylhexyle). <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/biotox.html> .

- **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).** (2013). Surveillance biologique de l'exposition au phtalate de di (2-ethylhexyle) (DEHP) dans six entreprises françaises.
- **Irvine S; Cawood E; Richardson D; Macdonald E; Aitken J.** (1996). Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *Biology Molecular Journal.*, **312**(7029), 467-71.
- **Jegou B.** (1996) Les hommes deviennent-ils moins fertiles ? Moins de spermatozoïdes et de qualité moindre ? L'environnement en question. *La Recherche*, **288** : 60-65.
- **Johnson K; Hensley J; Kelso M; Wallace D; Gaido K.** (2007). Mapping gene expression changes in the fetal rat testis following acute dibutyl phthalate exposure defines a complex temporal cascade of responding cell types. *Biol Reprod* 2007; **77**, 978-989.
- **Jost A ; Vigier B ; Prepin J ; Perchellet JP.** (1973). Studies on sex differentiation in mammals. *Rec Progr Horm Res* 1973; **29**:1-41.
- **Latini G.** (2005). Monitoring phthalate exposure in humans. *Clinica Chimica Acta.* nov; **361**(1-2):20-29.
- **Latini G; Del Vecchio A; Massaro M; Verrotti A; De Felice C.** (2006). Phthalate exposure and male infertility. *Toxicology* 2006; **226**:90-8.
- **Lau O; Wong K** (2000). Contamination in food from packaging material. *Journal of*
- **Lee B; Koo H.** (2007). Hershberger assay for antiandrogenic effects of phthalates. *J Toxicol Environ Health A* 2007, **70** : 1365-1370
- **Lezervant.** (2007). Activation des phénomènes de migration dans les emballages. Application à la sécurité alimentaire des aliments. Thèse de doctorat. INRA.15.
- **Lin H; Ge R; Chen G; Hu G; Dong L; Lian Q; Hardy D.** (2008). Involvement of testicular growth factors in fetal Leydig cell aggregation after exposure to phthalate in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**, 7218- 7222.
- **Liu K; Lehmann K; Sar M; Young S; Gaido K.** (2005). Gene expression profiling following in utero exposure to phthalate esters reveals new gene targets in the etiology of testicular dysgenesis. *Biol Reprod* 2005;**73**, 180-192.
- **Lu B; Bishop CE.** (2003). Late onset of spermatogenesis and gain of fertility in POG-deficient mice indicate that POG is not necessary for the proliferation of spermatogonia. *Biol Reprod* 2003;**69**:161-8.
- **Marcel H.** (2002). "Fonction emballage", Techniques de l'ingénieur, AG 6000,3 – 14.

- **Marie-Hélène D ; Karyn L ; Liza Vi; Lodovico D; Patrick L; Hélène B.** (2013). Ultra-trace analysis of hormones, pharmaceutical substances, alkylphenols and phthalates in two French natural mineral waters. *Science of the Total Environment* 443 (2013) 621–632.
- **Mark J.E.** (1999). Polymer data Handbook. *O.U. Press, Editor.*
- **Mkacher.** (2012). Vieillissement thermique des gaines PE et PVC. Thèse de doctorat. ParisTech. 17- 146.
- **Montuori P; Jover E; Morgantini M; Bayona JM; Triassi M.** (2008). Assessing human exposure to phthalic acid and phthalate esters from mineral water stored in polyethylene.
- **Muczynski V.** (2011). Polluants environnementaux et développement du testicule foetal humain : Effets et mécanismes d'action des phtalates. Thèse de doctorat en Biologie de la reproduction et du développement, université Paris-Sud 11. 55-105.
- **Office fédéral de l'environnement (OFEV).** (2011). [Compte rendu sur l'environnement.](http://www.bafu.admin.ch/umweltbeobachtung/02272/02276/index.html?lang=fr)<http://www.bafu.admin.ch/umweltbeobachtung/02272/02276/index.html?lang=fr>
- **Office fédéral de l'environnement (OFEV).** (2013). fiche d'information. Perturbateurs endocriniens
- **Office fédéral de la santé publique (OFSP).** (2012). Fiche d'information : les phtalates.www.bag.admin.ch/themen/chemikalien/00228/01378/index.html?lang=fr&download=NHZLpZeg7t,lnp6I0NTU04212Z6ln1ae2IZn4Z2qZpnO2Yuq2Z6gpJCLdIB6e2ym162epYbg2c_JjKbNoKSn6A—
- **Office fédéral de la santé publique (OFSP).** (2013). Phtalates - les plastifiants peuvent-ils rendre les hommes stériles ?
<http://www.bag.admin.ch/themen/chemikalien/00228/01378/index.html?lang=fr>
- **Organisation mondiale de la santé (OMS) ; United Nations Environment Programme (UNEP).** (2012). State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals. *Rapport conjoint.*
- **Organisation Mondiale de la Santé (OMS).** (2012). Endocrine disrupters and child health. Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health.
- **Orth JM; Gunsalus GL; Lamperti AA.** (1988). Evidence from sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 1988;122: 787–94.

- **Peijnenburg WJ et Struijs J.** (2006). Occurrence of phthalate esters in the environment of The Netherlands. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006, **63** : 204-215.
- **Pennarun P.** (2001). Migration from recycled PET bottles. *Elaboration and validation of a Chromatography A* 882, 255-270.
- **Pfab W.** (1973). Diffusion serscheinungen im System Kunststoff-FettD. r. *LebensmirrRdsch.* 69, 151.
- **Plastalger.com** . (2012). L'industrie algérienne des plastiques
- **Plasticisers.org.** (2010). Plasticisers. <http://www.plasticisers.org/plasticisers>
- **PlasticsEurop.org.** (2012). Plastiques 2012 – Faits et chiffres ; Analyse de la production et de la demande en plastiques & de la gestion des déchets en Europe en 2011.
- **Pouchert J.** (2006). The Aldrich library of FTIR spectra. 2A. *Aldrich chemical*.
- **Poulard F.** (1998). Adhesion du polyamide. Mécanismes et vieillissement hydrothermal, *in Science et genie des materiaux*.
- **REACH.** (2011). REACH for Polymers. Meilleures méthodes d'essai et techniques disponibles
- **Réseau environnement santé (RES).** 2012. Les phtalates : Sources d'exposition et imprégnation humaine. www.reseau-environnement-sante.fr
- **Ricard I.** (2011). Les perturbateurs endocriniens dans l'environnement de l'enfant et de l'adolescent et les risques pour la santé. L'exemple des phtalates et du bisphénol A. thèse pour obtenir le grade de docteur en médecine ; Paris. 60-80.
- **Riquet A ; Wolff N; Feigenbaum A.** (1998). Food and packaging interactions: determination of the kinetic parameters of olive oil diffusion in polypropylene using concentration profiles. *Food Additives and Contaminants*, 1998, Vol. 15, N°. 6, 690-700.
- **Rouiller-Fabre V; Lambrot V; Muczynski V; Coffigny H; Habert R.** (2008). Ontogenèse et régulations des fonctions testiculaires chez le foetus humain. Development and regulations of testicular functions in the human foetus. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 36 (2008) 898 907.
- **Rylee Phuong D; Richard W; Stahlhutb; Davide P; Frederick S; Saala V; Julia A.** (2012). Non-monotonic dose effects of in utero exposure to di(2-ethylhexyl)

- phthalate (DEHP) on testicular and serum testosterone and anogenital distance in male mouse fetuses. *Reproductive Toxicology* 34 (2012) 614– 621/2012
- **Safa L; Abbes B.** (2002). Experimental and Numerical Study of Sorption/diffusion of Esters into Polypropylene Packaging Film. *Packaging Technology and Sciences*, 2002, Vol. 15, 55-64
 - **Saillenfait** (2010). Etude du mode d'action reprotoxique de phtalates: Cas du phtalate de di n-hexyle, *B.4/2.164*.
 - **Saillenfait A ; Roudot A ; Gallissot F; Sabate J; Chagnon M.** (2011). Developmental toxic potential of di-n-propyl phthalate administered orally to rats. *J Appl Toxicol* 2011;31, 36-44
 - **Saillenfait A ; Laudet-Hesbert.** (2005). Phthalates. *EMC-Toxicologie Pathologie* 2 1–13
 - **Saillenfait A ; Sabaté J ; Gallissot F.** (2008). Diisobutyl phthalate impairs the androgen-dependent reproductive development of the male rat. *Reproductive Toxicology* 26 (2008) 107–115.
 - **Saillenfait A ; Sabaté J, Gallissot F.** (2009). Effects of *in utero* exposure to di-n-hexyl phthalate on the reproductive development of the male rat. *Reproductive Toxicology* 28 (2009) 468–476.
 - **Saillenfait A; Sabate J; Gallissot F.** (2009). Effects of in utero exposure to di-n-hexyl. *Reproductive Toxicology* 29(2009) 257–265.
 - **Sathyanarayana S; Alcedo G; Saelens B; Zhou C; L Dills R; Yu J; Lanphear B.**(2013). Unexpected results in a randomized dietary trial to reduce phthalate and bisphenol A exposures. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, doi:10.1038/jes.2013.9
 - **Scott H; Hutchison G; Jobling M; Mckinnell C; Drake A.** (2008). Relationship between androgen action in the "male programming window," fetal Sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinology* 2008, 149: 5280-5287.
 - **Senthil N; Ligy P.** (2009). Leaching of DEHA and DEHP from PET bottles to water. Environmental and Water Resources Division Department of Civil Engineering. Indian Institute of Technology Madras.
 - **Severin I ; Riquet A ; Chagnon M.** (2011). Évaluation et gestion des risques-Matériaux d'emballage à contact alimentaire. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 46(2), 59-66.

- **Sharpe RM.** (2006). Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20:91–110
- **Sharpe RM; Skakkebaek NE.** (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 1993;341: 1392–5.
- **Shultz V; Phillips S; Sar M; Foster P; Gaido K.** (2001). Altered gene profiles in fetal rat testes after in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 2001; 64, 233-242.
- **Sidman K. R; Valentine J. R; Whelan R. H.** (1981). Plasticizer migration from polyvinyl chloride film to solvents and foods. *Fd Chem. Toxic. Vol. 20,pp. 95 to 104.* 1982.
- **Simoneau C.** (2008). Food Contact Materials. 733-773.
- **Slama R; Jegou B; Cordier S.** (2006). Breakthroughs in the study of the influence of environmental factors on male reproductive health. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2006;54: 167–74.
- **Slama R; Jensen TK; Scheike T; Ducot B; Spira A; Keiding N.** (2006). How would a decline in sperm concentration over time influence the probability of pregnancy? *Epidemiology*, 15(4):458-465.
- **Sofie C ; Boberg J ; Axelstad M ; Dalgaard M ; Vinggaard AM; Metzdorff SB; Hass U.** (2010). Low-dose perinatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate induces anti-androgenic effects in male rats. *Reproductive Toxicology* 30 (2010) 313–321.
- **Srivastavas S; Awasthi VK; Srivastava SP; Seth PK.** (1989). Biochemical alterations in rat fetal liver following in utero exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Indian J Exp Biol* 1989, 27 : 885-888
- **Stroheker T; Regnier J; Lassurquere J; Chagnon M.** (2006). Effect of *in utero* exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate: distribution in the rat fetus and testosterone production by rat fetal testis in culture. *Food Chem Toxicol* 2006;44, 2064-2069
- **Stroheker T; Regnier JF; Lassurquere J; Chagnon MC.** (2006). Effect of in utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate: distribution in the rat fetus and testosterone production by rat fetal testis in culture. *Food Chem Toxicol* 2006, 44 : 2064-2069
- **Swan SH.** Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ. Res.* 2008 oct; 108(2):177-184.

- **Swan SH; Main KM; Liu F; Stewart SL; Kruse RL; Calafat AM.** (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 2005;113: 1056–61.
- **Tabb D; Koenig J.** (1975). Fourier Transform Infrared Study of Plasticized and Unplasticized Poly (vinyl chloride). *Macromolecules*, 8(6): p. 929-934.
- **Toppari J; Kaleva M; Virtanen HE.** (2001). Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 282–6.
- **Tyl R; Myers C; Marr M; Fail P; Seely J; Brine D; Barter R; Butala J H.** (2004). Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod Toxicol* 2004;18, 241-264
- **Vergnaud M.** (1991). Liquid transport processes in polymeric materials: modelling and industrial applications". *Prentice-Hall, Englewood cliffs, New Jersey*, pg362.
- **Virgilio A ; Eusepi A ; Romeo A ; Magrelli A.** (2010). In utero exposure to di-(2 ethylhexyl) phthalate affects liver morphology and metabolism in post-natal CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 2010; 29, 427-432.
- **Vitrac O ; Joly C.** (2007). Bases physicochimiques pour l'évaluation de la conformité des matériaux au contact des aliments.
- **Wittassek M; Angerer J; Kolossa-Gehring M; Schafer SD.** (2009). Fetal exposure to phthalates-a pilot study. *Int J Hyg Environ Health* 2009, 212 : 492-498.
- **Wittassek M; Hegerw; Koch H; Kolossa-Gehring M.** (2007). Daily intake of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) by German children A comparison of two estimation models based on urinary DEHP metabolite levels. *Int J Hyg Environ Health* 2007, 210 : 35-42.
- **Wolfe GW; Layton KA.** (2003). Multigeneration reproduction toxicity study in rats: multigenerational reproductive assessment by continuous breeding when administered to Sprague-Dawley rats in the diet. *TRC Study No. 7244-200*.
- **Yu Q ; Selvadurai A PS.** (2005). Mechanical behaviour of a plasticized PVC subjected to ethanol exposure. *Polymer Degradation and Stability* 89 (2005) 109-124.
- **Zaki O.** (2008). Contribution à l'étude et à la modélisation de l'influence des phénomènes de transferts de masse sur le comportement mécanique de flacons en polypropylène. Thèse de doctorat. Paris-Est. 15- 38.

Webographie

- <http://www.industrie.com/emballage/alimentaire/le-reglement-europeen-n10-2011-publie.18197>. Le règlement européen n°10/2011 publié
- <http://www.contactalimentaire.com/index.php?id=520&task=show&uid=2569&cHash=5317a49659>. Règlement CE n°10/2011 de la Commission du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires
- <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31967L0548:fr:NOT>. Directive n° 67/548/CEE du 27/06/67 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses.
- [http://www.contactalimentaire.com/fileadmin/ImageFichier_Archive/contact_alimentaire/Fichiers Documents/Directives/Rg 10-2011.pdf](http://www.contactalimentaire.com/fileadmin/ImageFichier_Archive/contact_alimentaire/Fichiers_Documents/Directives/Rg_10-2011.pdf). Le règlement CE n°10/2011, du 14 janvier 2011, concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.
- <http://www.mincommerce.gov.dz/fichiers09/loi0903fr.pdf>. Le décret exécutif n° 91-04 relatif aux matériaux destinés à être mis en contact avec les denrées alimentaires et les produits de nettoyage de ces matériaux.
- <http://www.mincommerce.gov.dz/fichiers09/loi0903fr.pdf>. Loi n09-03 du 29 Safar 1430 correspondant au 25 février 2009 relative à la protection du consommateur et à la répression des fraudes, article 07.

ANNEXE A**Vérification de certains paramètres de validation de la méthode UV****1) Linéarité de la méthode**

Les résultats des absorbances aux deux longueurs d'ondes fixées (225 et 275nm) pour les différentes concentrations de la gamme ont permis de tracer les courbes (figure A1) des absorbances en fonction des concentrations.

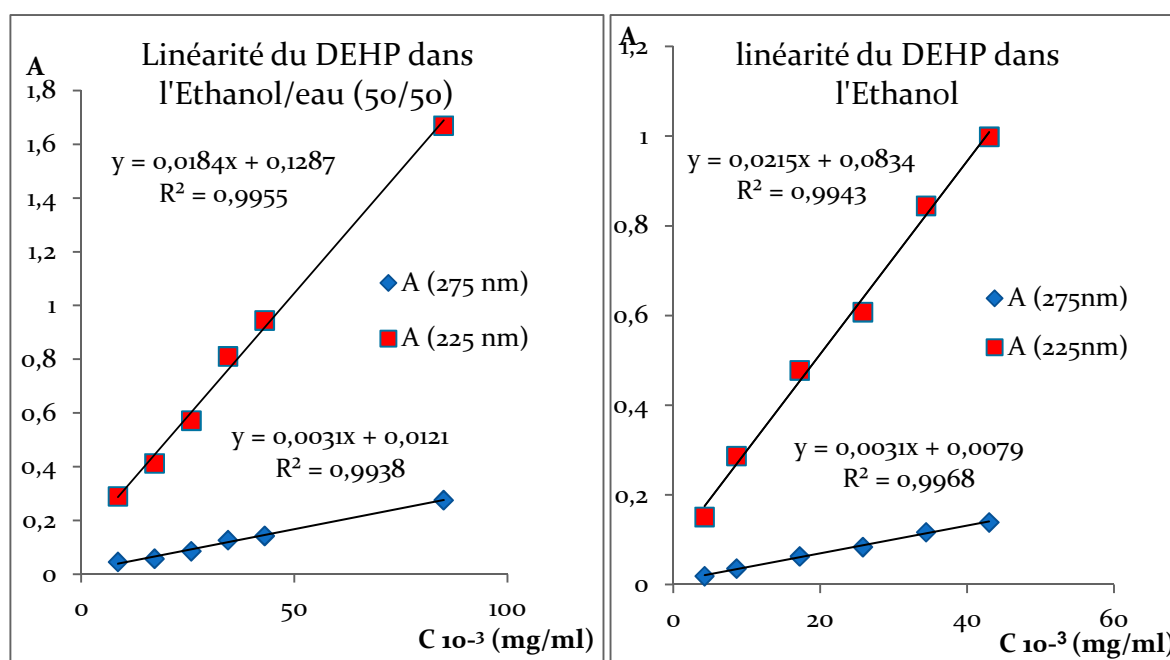


Figure A 1 : Linéarité du DEHP dans les deux milieux simulants d'aliments

Les graphes des absorbances en fonctions des concentrations dans les deux milieux, sont des droites linéaires de type $y = A x + B$, ce qui est en corrélation avec la loi de Beer Lambert.

Les coefficients de corrélation proche de 1 confirment la **bonne linéarité** de la méthode dans le domaine des concentrations choisies.

2) Sensibilité de la méthode

La méthode proposée ayant pour objectif la quantification du DEHP qui migre à partir du plastique tel le PVC, ce dernier peut se retrouver à l'état de trace ; il est donc intéressant d'étudier la limite de détection (la plus petite quantité qui peut être détectée).

A des concentrations inférieures à $4 \cdot 10^{-3}$ mg/ml, les valeurs des absorbances ne sont plus significatives ; la limite de détection retenue est donc : $C_{\text{limite}} \sim 4 \cdot 10^{-3}$ mg/ml. Cette méthode est donc pas sensible et ne permet pas de doser le DEHP à l'état de traces.

3) Spécificité de la méthode

Le matériau vierge a subi un reflux dans l'éthanol pur, le balayage n'a pas montré d'absorbance significatives aux deux longueurs d'onde, ce qui signifie que la méthode est spécifique.

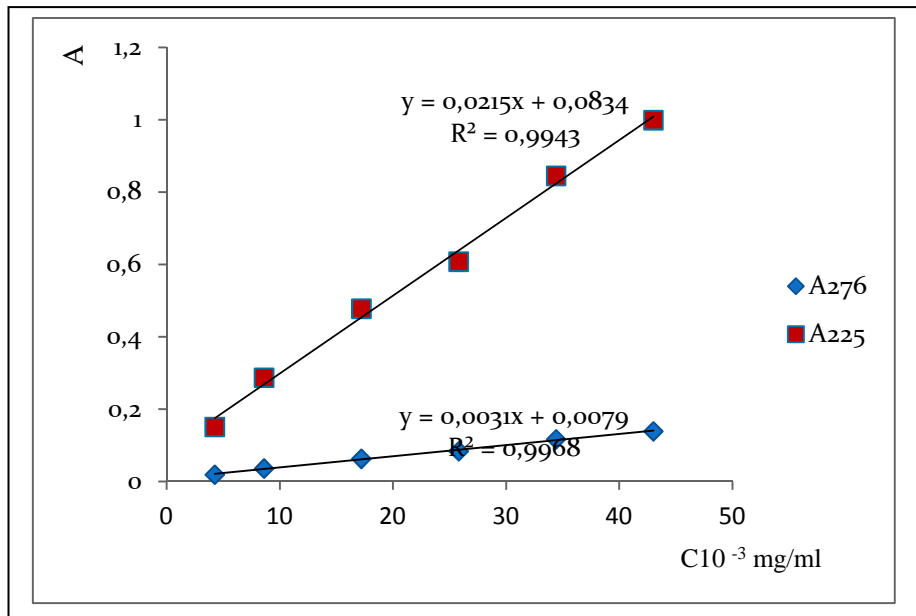
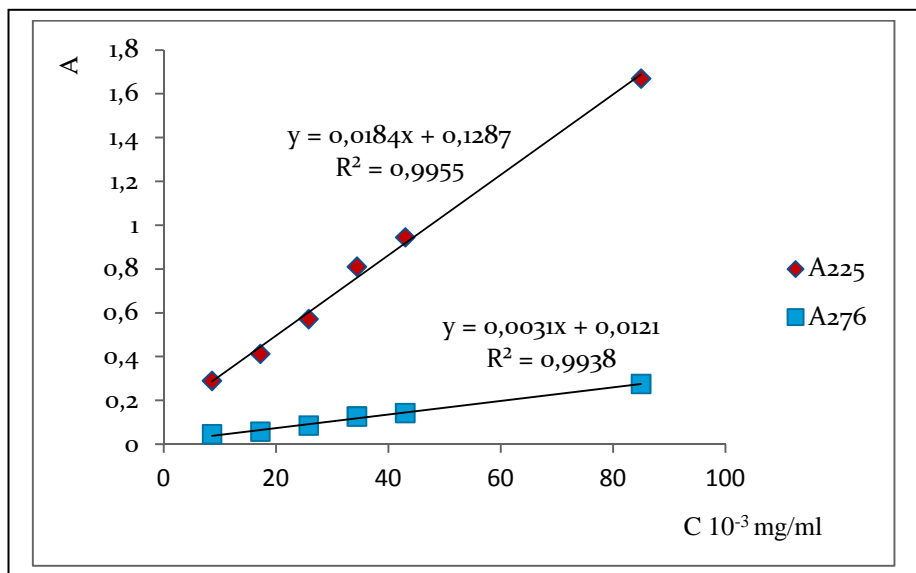
Conclusion :

Les résultats obtenus de l'étude des différents paramètres de validation montrent :

- Une bonne spécificité
- Une bonne linéarité
- Manque de sensibilité

Elle peut être proposée pour le suivi de la migration du DEHP à partir du PVC dans les milieux simulateurs d'aliments.

La méthode spectrométrique FTIR va permettre de vérifier la diffusion du DEHP à partir du film plastique en PVC et la spectrométrie UV- visible va confirmer sa présence dans les milieux simulateurs.

ANNEXE B**Courbes d'étalonnage du DOP dans les milieux simulateurs par UV****Figure B.1. Courbe d'étalonnage du DOP dans éthanol 96°****Figure B.2. Courbe d'étalonnage du DOP dans éthanol 50 %.**

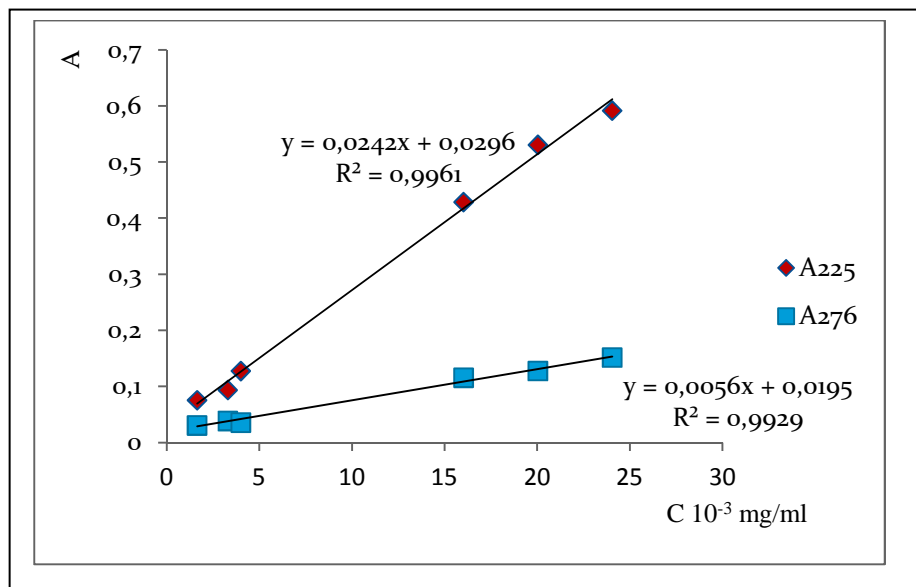


Figure B.3. Courbe d'étalonnage du DOP dans eau distillée