

# Évaluation du potentiel écotoxicologique de substituant de parabènes dans un modèle de larve de poisson zèbre

*Présenté par :* Antoine TOURRET

*Maîtres de stage :* Laure GARRIGUE-ANTAR et Fidji  
SANDRÉ

université  
de **BORDEAUX**

Licence mention Sciences de la vie parcours Sciences du vivant : Organismes & Ecosystèmes

**leesu**

laboratoire eau environnement systemes urbains

# Préambule – le projet COSMET'EAU



« Changements de pratiques pour les produits cosmétiques : des lanceurs d'alerte aux impacts sur les milieux aquatiques »



①

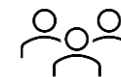
Comprendre les processus de **lancement d'alerte/sensibilisation** des consommateurs et des pouvoirs publics

②

Développer des **outils techniques/sociologiques** pour caractériser les pratiques de consommations des PCP, leurs compositions (additifs + substituants) et quantifier leurs effets sur le milieu récepteur

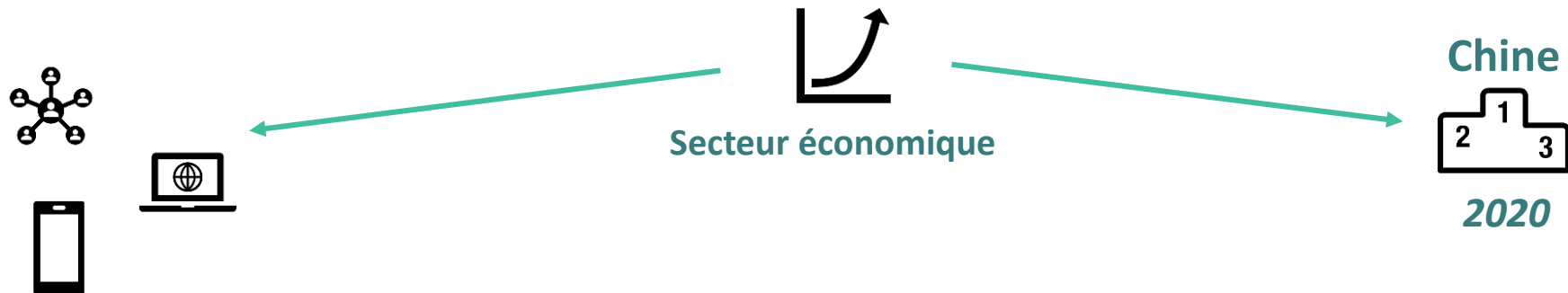
③

Proposer aux collectivités des outils qui permettent de changer nos pratiques et à terme **limiter les rejets**



# Éléments introductifs – Les PCP, contextualisation

*toute substance ou tout mélange destiné à être mis en contact avec les parties superficielles [...] en vue exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles. »*



## Pourquoi s'intéresse-t-on aux PCP en particulier ?

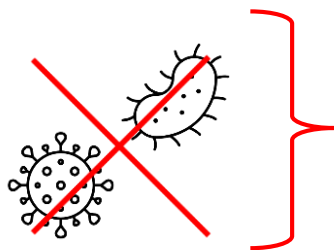
*Comité scientifique des produits cosmétiques et des produits non alimentaires*



2016

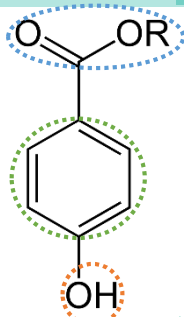
Exposition journalière aux PCP pour une personne : **17.4 g.jour<sup>-1</sup>**

# Éléments introductifs – Les PB et leurs substituants



Parabènes (PB)

1924



PB

2005



Cancer du sein

Plan d'alerte en France

Formules sans PB

~~Formules avec PB~~

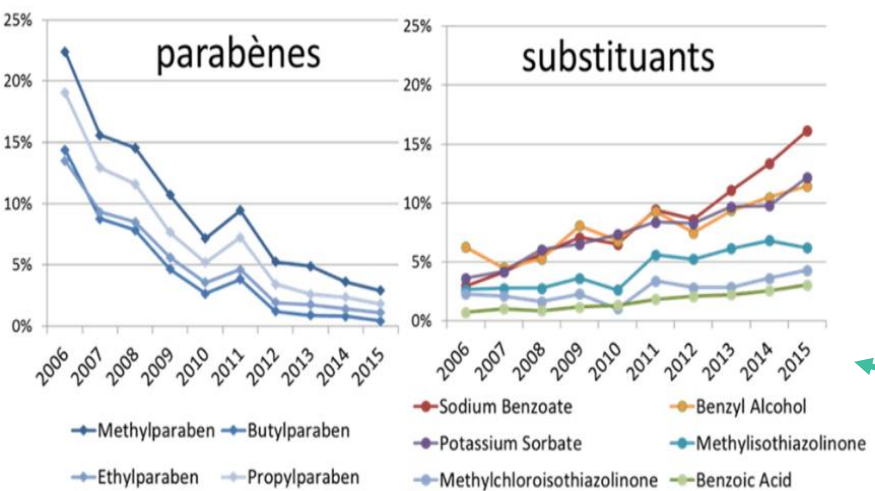


Figure 1 : Evolution annuelle en % des cosmétiques contenant des PB (à gauche) et des substituants (à droite)

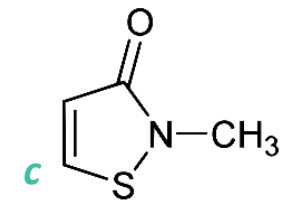
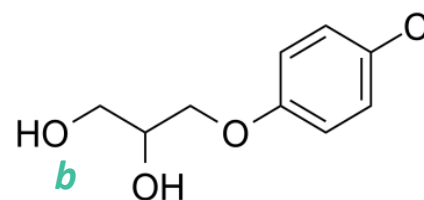
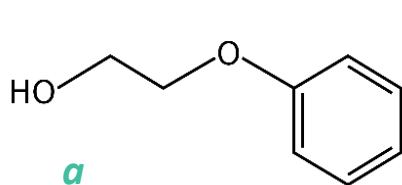
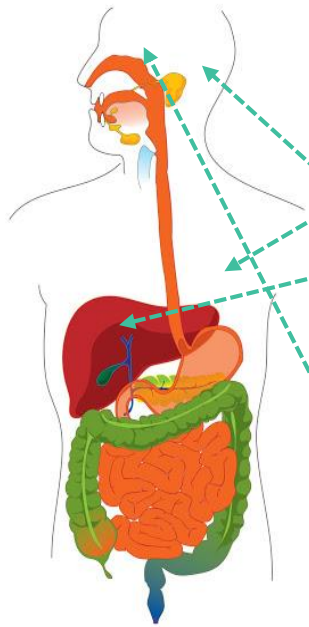


Figure 2 : Formules topologiques du 2-PE (a), de la CPN (b) et de la MIT (c)

# Éléments introductifs – Les PB et leurs substituants

## La toxicité de ces molécules



**PB** : détérioration des membranes mitochondriales

↳ [ATP] + ☠ cellulaire

**PB** : cancer du sein + perturbateur endocrinien

**MIT** : liaisons à l'ADN cellules hépatiques + réactions allergiques cutanées

**CPN** : provoque ↓ activité phosphodiésterase

↳ [ATP] + ↑ [AMPC]

**CPN + PE** : ↓ voie de signalisation

Akt ☠ cellulaire  
glande Meibomius

## L'écotoxicité de ces molécules

Substances	Modèle	Temps (heures)	EC50 (mg/L)	Sources
MeP	<i>Danio rerio</i>	48	75.8	LEESU
MeP	<i>Danio rerio</i>	72	40.9	LEESU
MIT	<i>Danio rerio</i>	48	40.9	LEESU
MIT	<i>Daphnia magna</i>	48	0.513	[39]
MIT	<i>Danio rerio</i>	72	33.5	LEESU
CPN	<i>Danio rerio</i>	48	167	LEESU
CPN	<i>Danio rerio</i>	72	153.9	LEESU
PE	<i>Danio rerio</i>	48	?	LEESU
PE	<i>Danio rerio</i>	72	?	LEESU
PE	<i>Danio rerio</i>	144	486.35	[37]

Figure 3 : Les valeurs d'EC50 des molécules



Stage 2021

Rassembler l'ensemble des données déjà générées

Etudier la toxicité et l'écotoxicité de 3 substituants et en particulier celle du PE

Interpréter l'ensemble des résultats

# Matériels et méthode – Principes

- ① L'extraction et le traitement de données  
*Statistiques + représentation graphique*



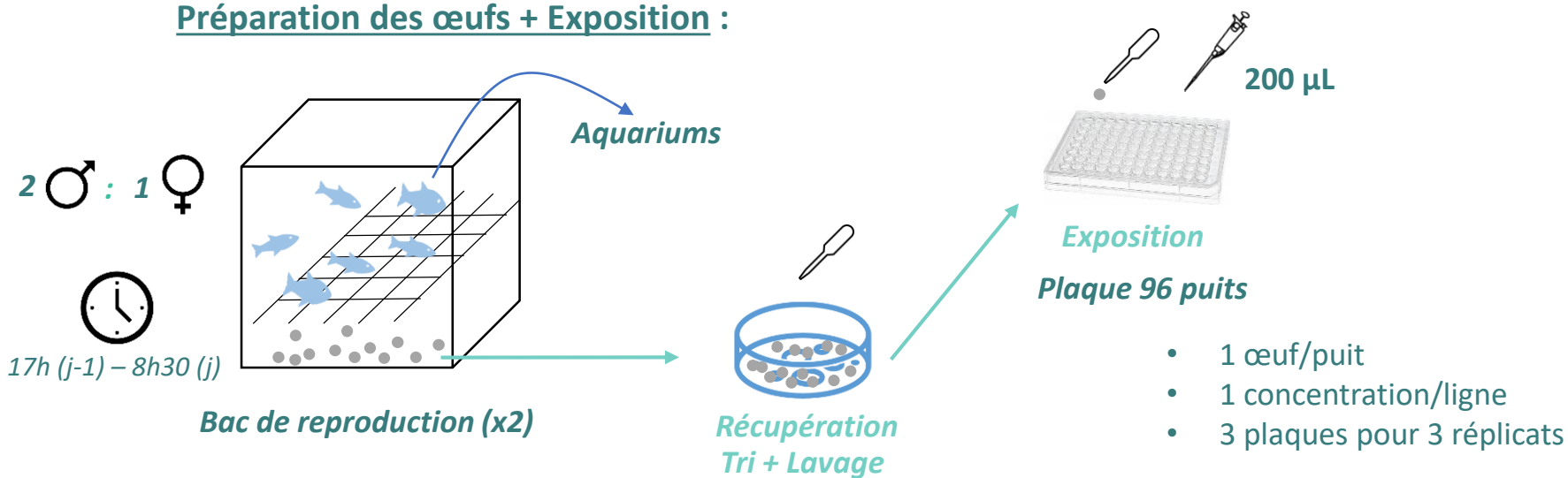
- ② Détermination d'une EC50 pour le PE

## Préparation des gammes d'exposition : 2 gammes

Tableau 1: Les points de concentration des 2 gammes de PE

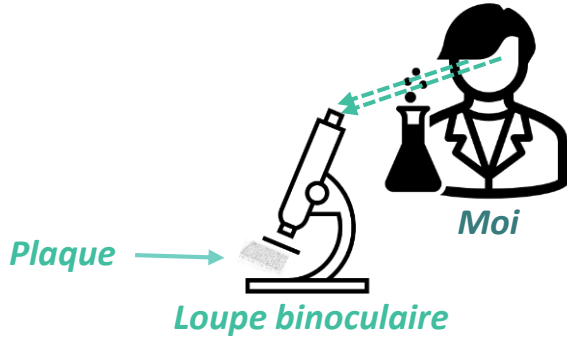
Première gamme PE (mg/L)	0	/	/	200	400	600	800	1 000
Deuxième gamme PE (mg/L)	0	250	300	350	400	500	550	600

## Préparation des œufs + Exposition :

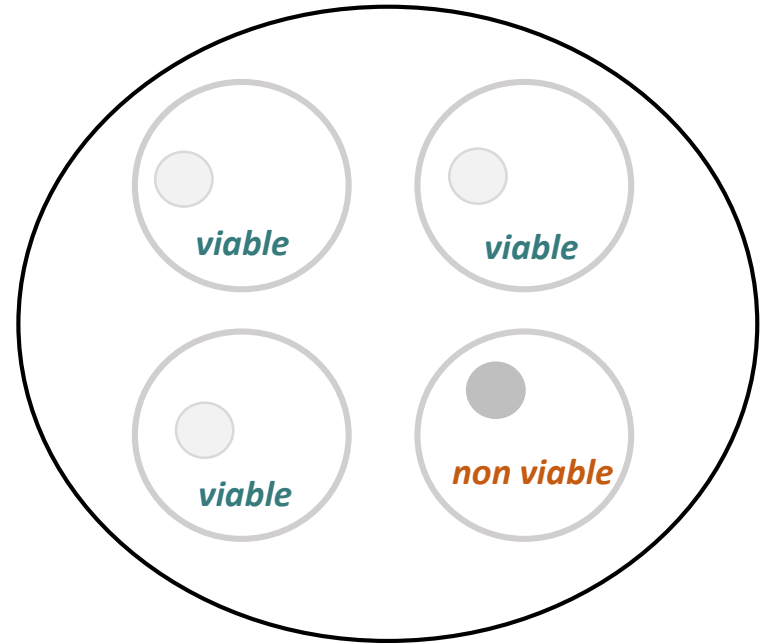


# Matériels et méthode – Principes

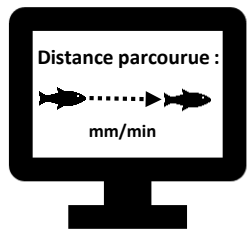
Observation des œufs à 24, 48 et 72h d'exposition :



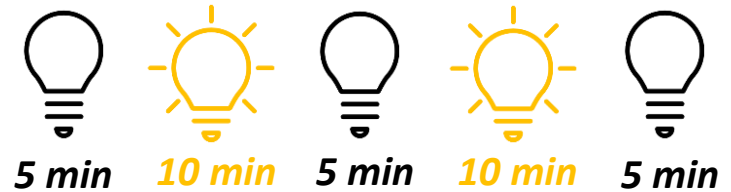
*Ce que je vois :*



## 3 Les tests de stress



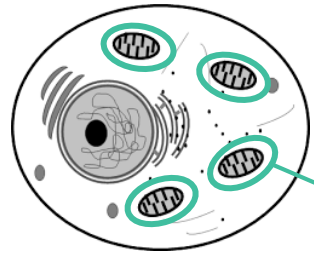
1h34



**Obscurité = stress**

# Matériels et méthode – Principes

## 4 Les tests d'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale



Cellule eucaryote



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Spectrophotomètre à double faisceau

Mesure en simultané l'absorbance de 2 cuves

Roténone

Inhibiteur spécifique du complexe I

Témoin négatif



1



2

Polluant (échantillon)

Compare avec l'Abs du témoin

Qui dit grande absorbance par rapport au témoin négatif, dit grande quantité de cytochrome c réduit

Qui dit grande quantité de cytochrome c réduit dit bons transferts d'électrons

Qui dit bons transferts d'électrons dit chaîne respiratoire mitochondriale viable

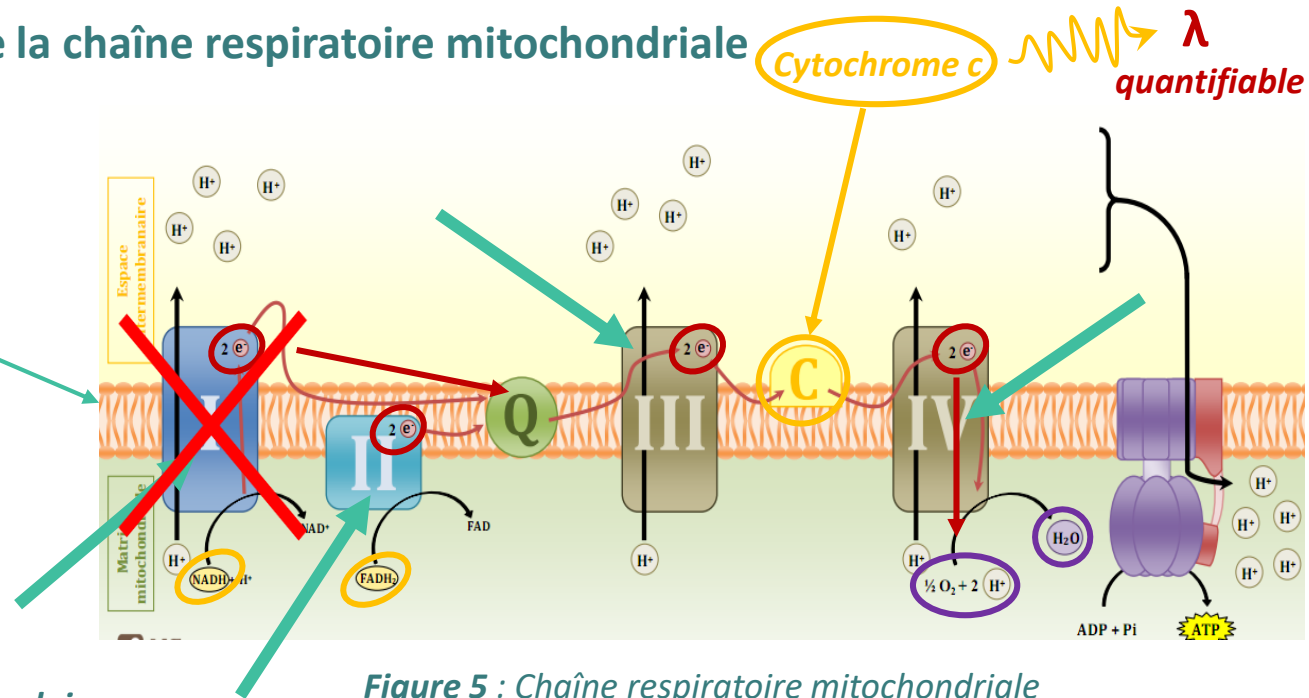
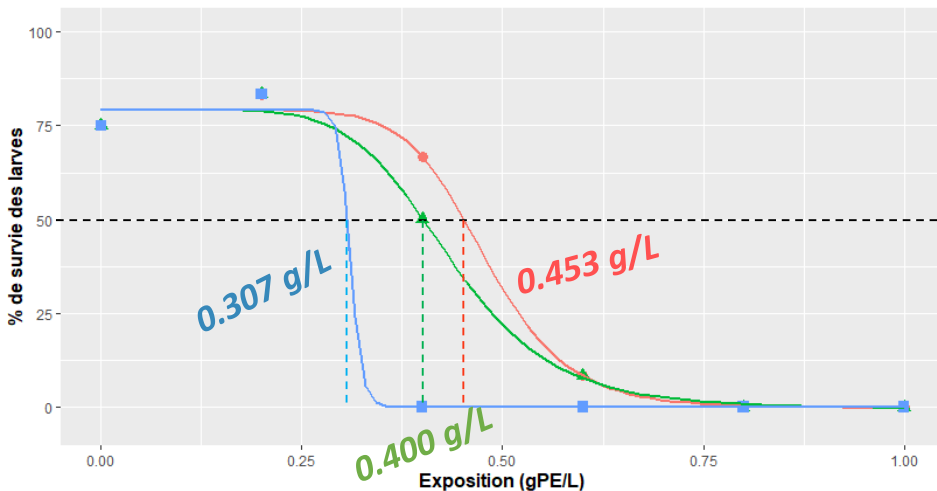


Figure 5 : Chaîne respiratoire mitochondriale



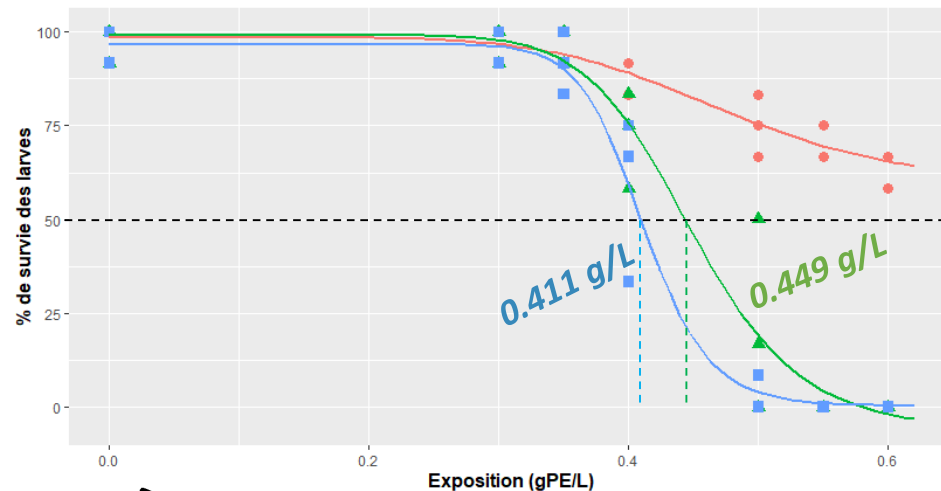
# Résultats – PARTIE 1 : EC50

Première gamme de PE : 200 – 1 000 mg/L



1 plaque donc n = 12/point de concentration

Deuxième gamme de PE : 200 – 600 mg/L



3 plaques donc n = 36/point de concentration

Figure 5 : Pourcentage de survie des larves de poissons zèbres en fonction de la concentration de 2-PE à 24h, 48h et 72h d'exposition

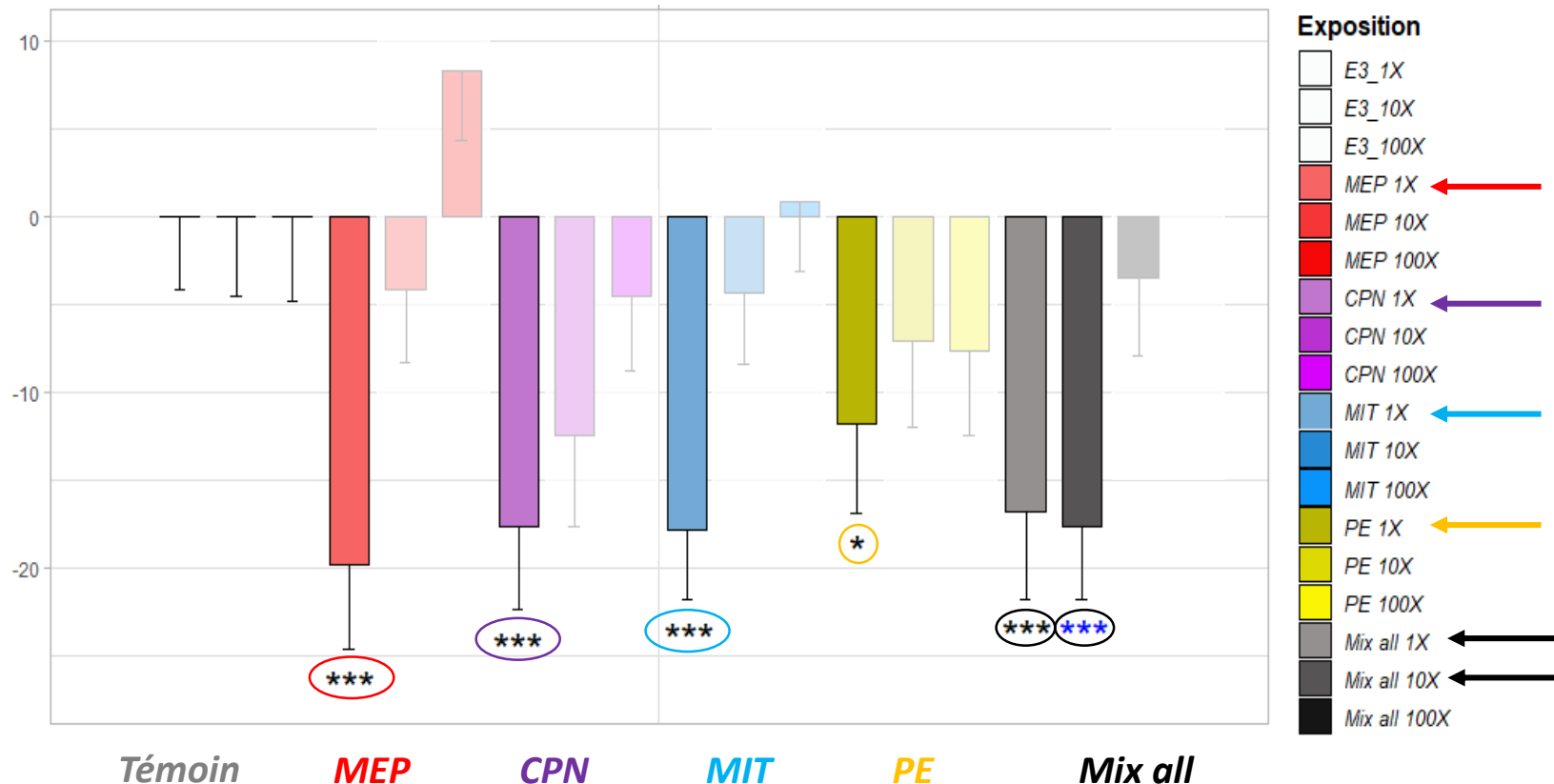


Takeaways :

Tableau 2 : Récapitulatif des EC50

		Les EC50 obtenues pour les deux gammes de PE		
		24h	48h	72h
→	Première gamme PE (g/L)	0.453	0.400	0.307
→	Deuxième gamme PE (g/L)	/	0.449	0.411

# Résultats – PARTIE 2-a : Tests de stress



## Takeaways :

- Le MeP et ses substituants induisent une inhibition significative de l'activité larvaire
- L'inhibition locomotrice est significative dès les concentrations environnementales (1X)
- L'effet cocktail accentue la toxicité induite sur les larves

# Résultats – PARTIE 2-b : Tests de stress

**Hypothèse :** D'anciens résultats ont montré que le PE pouvait masquer la toxicité du MeP. De nouveaux mélanges ont été réalisés pour savoir si le PE pouvait également masquer la toxicité de la CPN et de la MIT

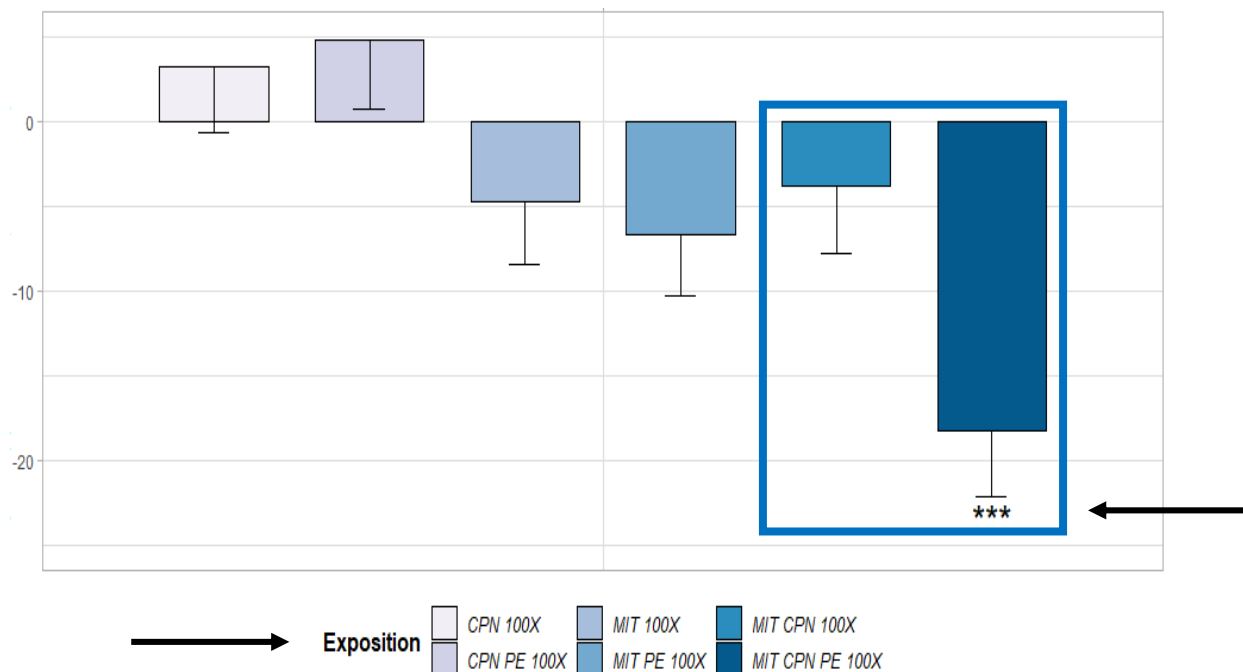


Figure 7 : Différence de distance parcourue des larves exposées entre les mélanges avec et sans PE

## Takeaways :

- Les résultats ne semblent pas montrer une diminution de toxicité lorsque le PE est en mélange avec la CPN, la MIT ou la CPN + MIT

# Résultats – PARTIE 2-c : Tests de stress

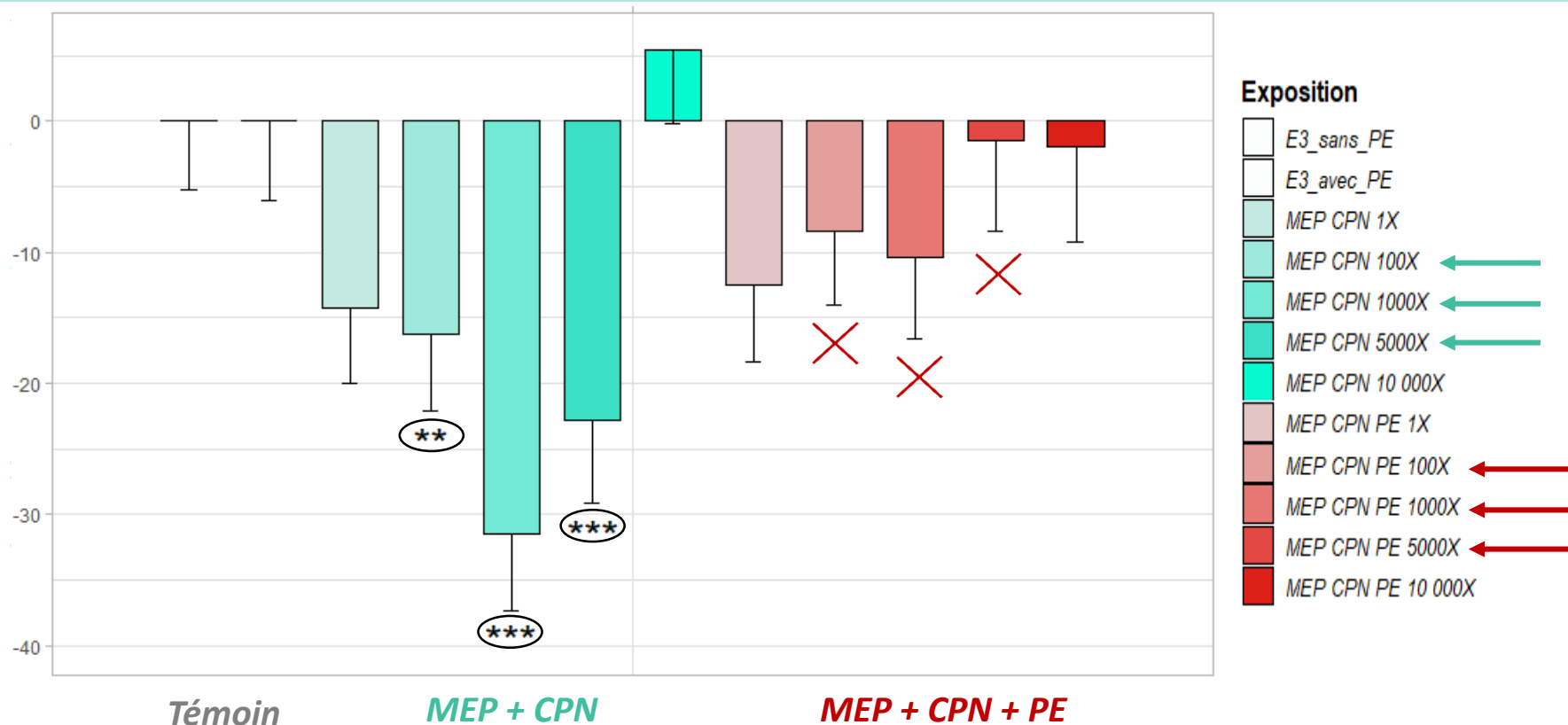


Figure 8 : Différence de distance parcourue des larves exposées à un polluant par rapport au témoin



## Takeaways :

- Les résultats semblent montrer que lorsque le PE est en mélange avec du MeP, la toxicité du mélange est diminuée
- Ces résultats corroborent notre hypothèse précédente

# Résultats – PARTIE 3 : Test d'inhibition de la CRM

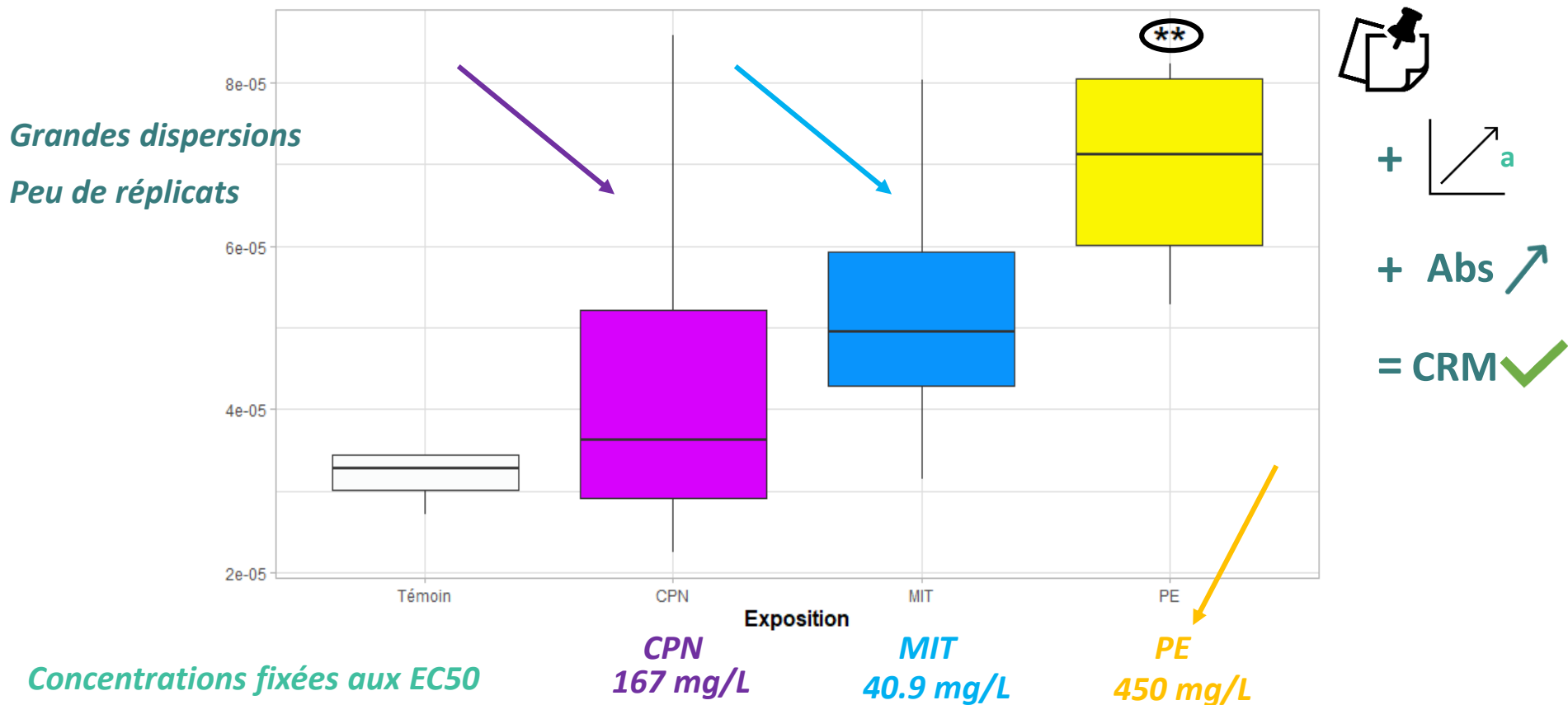


Figure 9 : Valeurs des coefficients directeurs des courbes d'absorbance observés pour les différents composés

## 🔍 Takeaways :

- Les trois composés n'induisent pas d'inhibition de la CRM
- Le PE pourrait être un stimulateur de la CRM en facilitant les transferts d'électrons au vu de l'augmentation de l'absorbance (à vérifier avec d'autres essais)

# Conclusion & Perspectives

→ Des valeurs d'EC50 sont connues pour la CPN, la MIT et le PE.

*CPN*  
167 mg/L

*MIT*  
40.9 mg/L

*PE*  
450 mg/L

→ Les tests de stress ont montré que la CPN, la MIT et le PE induisent une inhibition de l'activité locomotrice des larves dès les concentrations environnementales.

→ Lorsque les substituants sont en cocktail, le mélange induit une toxicité encore plus forte que celle observée lorsque les composés sont seuls.

→ Le PE ne semble pas « masquer » la toxicité de la CPN et de la MIT mais uniquement celle du MeP.

→ Aucun des trois substituants inhibent la chaîne respiratoire mitochondriale pour des concentrations fixées aux EC50. Néanmoins, le PE pourrait stimuler les transferts d'électrons de la chaîne. Ceci reste à confirmer en réalisant des nouveaux essais.

The background of the slide is a photograph of a city skyline across a body of water. In the foreground, there are reeds and lily pads in the water. The sky is blue with some light clouds. The overall color palette is dominated by blues and greens.

# leesu

laboratoire eau environnement systemes urbains

Je vous remercie pour votre attention

# Bibliographie

- Cicchetti F., Drouin-Ouellet J., Gross R.R. Environmental toxins and Parkinson's disease : what have we learned from pesticide-induced animal models ? Trends in Pharmacological Sciences, 2009, vol. 30, p.475-483.
- Darbre P.D., Aljarrah A., Miller W.R., Coldham N.G., Sauer M.J., Pope G.S. *Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours. Journal of Applied Toxicology.* 2004, vol. 24, p. 5-13.
- Edelson J., McMullen J.P. *Interactions of chlorphenesin and divalent metal ions with phosphodiesterase.* Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 1976, vol. 223, p.24-33.
- Garrigue-Antar L., Bressy A., Guttman Y., Saichi M., Leroyer C., Moilleron R., Morin C. (2019). *Impacts écotoxicologiques d'agents conservateurs de produits cosmétiques dans un modèle de poisson zèbre dans le cadre de la Société Ecotoxicologique Fondamentale et Appliquée.* Île-de-France, France.
- Hahn M.E., Timme-Lagary A.R., Karchner S.I., Stegeman J.J. *Nrf2 and Nrf2-related proteins in development and developmental toxicity : Insights from studies in zebrafish (Danio rerio).* Free Radical Biology and Medicine, 2015, vol. 88, p.275-289.
- Journal officiel de l'Union européenne. *Règlement (CE) n°1223/2009 du parlement européen et du conseil.* 2009. 151 p. L 342/59.
- Kalyanaraman B., Korytowski W., Pilas B., Sarna T., Land E.J., Truscott T.G. *Reaction between ortho-semiquinones and oxygen : Pulse radiolysis, electron spin resonance, and oxygen uptake studies.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1988, vol. 166, p.277-284.
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F. *Stages of Embryonic Development of the Zebrafish.* National Library of Medicine, 1995, vol.203, n°3, p.253-310.
- Lundov M.D., Krongaard T., Menné T.L., Johansen J.D. *Methylisothiazolinone contact allergy : a review.* British Journal of Dermatology, 2011, vol. 165, p.1178-1182.
- Lorenzetti O.J., Wernet T.C. *Topical Parabens : Benefits and Risks.* Dermatologica, 1977, vol. 154, p.244-250.



# Bibliographie

- Nakagawa Y., Moldéus P. *Mechanism of p-Hydroxybenzoate Ester-induced Mitochondrial Dysfunction and Cytotoxicity in Isolated Rat Hepatocytes*. Biochemical Pharmacology, 1998, vol. 55, p. 1906-1914.
- Park E.J., Kim S., Chang J. Methylisothiazolinone may induce cell death inflammatory response through DNA damage in human liver epithelium cells. Environmental Toxicology, 2018, vol. 33, p.156-166.
- Peng X., Zhu Y., Liu X., Zhang Y., Ji Y., Yang X., Zhang Y., Guo N., Li Q. *Anxietyrelated behavioral responses of pentylenetetrazole-treated zebrafish larvae to light-dark transitions*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2016, vol. 145, p.55-65.
- Rebecca K.M., Angerer J., Dierkes G., Brüning T., Holger M.K. *Metabolism and elimination of methyl, iso- and n-butyl paraben in human urine after single oral dosage*. Toxicokinetics and Metabolism, 2016, vol. 90, p.2699-2709.
- Sarkani I. *Contact dermatitis from paraben*. British Journal of Dermatology, 1960, vol. 72, p.345-347.
- Scientific Committee on Consumer Safety. *The SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 9th revision*. European Commission, SCCS, 2016. 151 p. N° 1564/15
- Sifak ZEDEK. *Dynamique de polluants émergents (parabènes, triclosan et triclocarban) dans le continuum eaux grises – milieu récepteur*. PhD : Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains. Paris-Est Créteil, 2016. 244 p.
- Statista. *Prévision de la valeur marché mondial des produits du maquillage de 2019 à 2025*. [En ligne]. Disponible sur : <https://fr.statista.com/statistiques/505156/produits-maquillagevaleur-marche/>
- Steter J.R., Dionisio D., Lanza M.R.V., Motheo A.J. *Electrochemical and sonoelectrochemical processes applied to the degradation of the endocrine disruptor methyl paraben*. J Appl Electrochem, 2014, vol. 44, p.1317-1325
- Strange R.C., Jones P.W., Fryer A.A. *Glutathione S-transferase : genetics and role in toxicology*. Toxicology Letters, 2000, vol. 112-113, p.357-363.
- Wang J., Liu Y., Kam W.R., Li Y., Sullivan D.A. *Toxicity of the cosmetic preservatives parabens, phenoxyethanol and chlorphenesin on human meibomian gland epithelial cells*. Experimental eye research, 2019, vol. 196.
- Wikipédia l'encyclopédie libre. Parabène. [En ligne]. Disponible sur : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Parab%C3%A8ne>