

Avec le soutien de



Cosmet'eau

Livrable 2.1

Méthodologies chimiques et écotoxicologiques de surveillance des résidus de produits cosmétiques dans les milieux aquatiques

Février 2017

Auteurs : Adèle Bressy, Bertille Bonnaud, Émilie Caupos, Laure Garrigue-Antar, Anthony Marconi, Rémi Mazerolles, Christophe Morin, Laurent Paulic, Prunelle Waldman, Sifax Zedek et Régis Moilleron

Citation du rapport : Bressy A., Bonnaud B., Caupos E., Garrigue-Antar L., Marconi A., Mazerolles R., Morin C., Paulic L., Waldman P., Zedek S. et Moilleron R. (2016). Méthodologies chimiques et écotoxicologiques de surveillance des résidus de produits cosmétiques dans les milieux aquatiques. Livrable 2.1 du projet *Cosmet'eau*.



Table des matières

Table des matières	3
Liste des abréviations.....	5
Liste des illustrations.....	7
Liste des tableaux.....	8
Introduction.....	9
1 Échantillonnage passif du triclosan et du triclocarban dans les milieux aquatiques	10
1.1 Développement du protocole de nettoyage, dopage et extraction des membranes	10
1.1.1 Méthodologie suivie.....	10
1.1.2 Résultats des tests de développement	11
1.1.2.1 Choix du type de membrane	11
1.1.2.2 Choix du solvant et de la durée de dopage.....	12
1.1.2.3 Choix du solvant et de la durée de la dialyse	13
1.1.3 Protocole en routine	13
1.2 Calibration en laboratoire	14
1.2.1 Modèle théorique	14
1.2.2 Description du pilote et protocole expérimental.....	14
1.2.3 Résultats de l'essai préliminaire.....	16
1.2.4 Influence du pH	18
1.2.5 Calibration des constantes cinétiques et thermodynamiques	19
1.3 Application en Seine.....	23
1.3.1 Exposition <i>in situ</i>	23
1.3.2 Calcul des concentrations dans l'eau à partir des concentrations accumulées	23
2 Analyse de l'évolution temporelle des concentrations en parabènes dans les eaux usées	24
2.1.1 Description des sites et des campagnes d'échantillonnage	24
2.1.2 Protocole d'analyse des échantillons.....	25
2.1.3 Calcul des flux par équivalent-habitant	26
3 Screening ciblé des substituants aux parabènes par spectrométrie de masse haute	27
résolution	27
3.1 Présentation des molécules	27
3.2 Recherche bibliographique sur l'analyse des substituants.....	30
3.3 Développement de la méthode	30
4 Évaluation de l'impact écotoxicologique de la substitution des parabènes.....	33
4.1 Approche théorique	33

4.2	Approche globale par bioessais : qualité d'eaux grises synthétiques représentant différentes pratiques de consommation	33
4.2.1	Préparation des eaux grises synthétiques représentant différentes pratiques de consommation.....	33
4.2.1.1	Sélection des produits	33
4.2.1.2	Protocole de préparation des échantillons d'eaux grises synthétiques	34
4.2.2	Bioessais	36
4.2.2.1	Toxicité générale	38
4.2.2.2	Perturbation endocrinienne.....	39
4.2.2.3	Génotoxicité	39
4.3	Approche par substances : effets des parabènes et de leurs substituants, seuls ou en mélange, sur zebra fish	40
4.3.1	Présentation du poisson zèbre.....	41
4.3.2	Protocole expérimental.....	42
4.3.2.1	Production des œufs et exposition aux solutions à tester	42
4.3.2.2	Préparation des solutions à tester	43
4.3.2.3	Observations réalisées	43
4.3.3	Expérimentations réalisées	43
4.3.3.1	Courbes dose-réponse des molécules seules.....	43
4.3.3.2	Courbes dose-réponse des molécules en mélange avec le phénoxyéthanol.....	43
4.3.3.3	Courbes dose-réponse d'un mélange de substances.....	44
	Références bibliographiques.....	45
	Annexe 1 : analyse de sensibilité du modèle de calibration des membranes polymériques et intégration des équations du modèle	48

Liste des abréviations

Ac	Acétone
ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
ANR	Agence nationale de la recherche
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
BzP	Benzylparabène
BuP	Butylparabène
CMI	Chlorométhylisothiazolinone
CPN	Chlorphénésine
DCM	Dichlorométhane
EF	Efficiencie
EH	Équivalent-habitant
ESI	Ionisation par électronébuliseur (<i>Electrospray ionization</i> en anglais)
EtP	Ethylparabène
FME	Module du logiciel R (<i>Flexible Modelling Environment for Inverse Modelling</i> en anglais)
isoBuP	Isobutylparabène
Kow	coefficient de partage octanol/eau
Ksw	coefficient de partage membrane-eau
LDPE	Polyéthylène basse densité (<i>Low Density PolyEthylene</i> en anglais)
LOQ	Limite de quantification (<i>Limit of quantitation</i> en anglais)
MeOH	Méthanol
MeP	Méthylparabène
MeTCS	Méthyltriclosan
MIT	Méthylisothiazolinone
MRM	Mode d'acquisition des données structurales (<i>Multiple Reaction Monitoring</i> en anglais)
MS	Spectrométrie de masse (<i>Mass spectrometry</i> en anglais)
MSE	Erreur quadratique moyenne (<i>Mean Squared Error</i> en anglais)
NIST	National Institute of Standards and Technology

NQE	Norme de qualité environnementale
NTK	Azote Kjeldhal Total (<i>Nitrogen total Kjeldajhl</i> en anglais)
PB	Parabènes
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PE	Phénoxyéthanol
pKa	Constante d'acidité
PRC	Composé de référence de performance (<i>Performance Reference Compound</i> en anglais)
PrP	Propylparabène
rpm	Révolution par minute
STEU	Station d'épuration des eaux usées
TCC	Triclocarban
TCS	Triclosan
UPLC-MSMS	Chromatographie liquide ultra performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with tandem mass spectrometry</i> en anglais)

Liste des illustrations

Figure 1 : Évolution des produits cosmétiques mis sur le marché contenant des parabènes (A) et contenant leurs substituants (B).....	9
Figure 2 : Premiers tests sur les membranes LDPE (en bleu) et PDMS (en vert).....	11
Figure 3 : Seconds tests sur les membranes LDPE et PDMS	11
Figure 4 : Comparaison de la capacité d'accumulation entre le LDPE et le PDMS (dopage pendant 24 h dans un mélange MeOH/eau - 20/80).....	12
Figure 5 : Comparaison des rendements de dopage en fonction du solvant de dopage (dopage pendant 24 h)	12
Figure 6 : Comparaison des pourcentages de récupération en fonction du solvant et du temps de dialyse.....	13
Figure 7 : Pilote de calibration des membranes polymériques	15
Figure 8 : Cinétiques de désorption et d'absorption du TCS	16
Figure 9 : Cinétiques de désorption et d'absorption du TCC	16
Figure 10 : Cinétiques de désorption et d'absorption du TCSd3	17
Figure 11 : Cinétiques de désorption et d'absorption du MeP	17
Figure 12 : Cinétiques de désorption et d'absorption de l'EtP	17
Figure 13 : Cinétiques de désorption et d'absorption du PrP	17
Figure 14 : Cinétiques de désorption et d'absorption du BuP	17
Figure 15 : Cinétiques de désorption et d'absorption du iBuP	18
Figure 16 : Cinétiques de désorption et d'absorption du BzP.....	18
Figure 17 : Influence du pH sur les cinétiques d'échange entre le PDMS et l'eau pour le TCS (C_s la teneur dans la membrane dopée, C_c la teneur dans la membrane propre)	19
Figure 18 : Cinétique d'accumulation et de désorption du TCS, comparaison des données expérimentales et modélisées (la mention « obs » concerne les données expérimentales, la mention « mod » concerne les données modélisées, les mentions mod-min et mod-max concernent les analyses de sensibilités sur k_e)	21
Figure 19 : Cinétique d'accumulation et de désorption du TCS d3, comparaison des données expérimentales et modélisées (la mention « obs » concerne les données expérimentales, la mention « mod » concerne les données modélisées, les mentions mod-min et mod-max concernent les analyses de sensibilités sur k_e)	21
Figure 20 : Cinétique d'accumulation et de désorption du TCC, comparaison des données expérimentales et modélisées (la mention « obs » concerne les données expérimentales, la mention « mod » concerne les données modélisées, les mentions mod-min et mod-max concernent les analyses de sensibilités sur k_e)	22
Figure 21 : Erreur relative du modèle pour le TCS.....	22
Figure 22 : Erreur relative du modèle pour le TCSd3.....	22

Figure 23 : Erreur relative du modèle pour le TCC.....	22
Figure 24 : Emplacement des différents échantillonnages.....	25
Figure 25 : Protocole d'analyse des parabènes, triclosan et triclocarban (Darine Geara-Matta, 2012).....	26
Figure 26 : Schéma des échantillons d'eaux grises synthétiques	34
Figure 27 : Poisson zèbre (normal à gauche et albinos à droite).....	41
Figure 28 : Larves de poisson zèbre développées normalement (1 : tête ; 2 : yeux ; 3 : queue ; 4 : formation des nageoires latérale ; 5 : sac Vitellin ; 6 : vessie natatoire)La vie du poisson zèbre commence par l'état embryonnaire entre 0 et 72 h, puis l'état larvaire après éclosion de l'œuf entre 72 h et 29 jours. Il passera ensuite par l'état juvénile avant d'atteindre l'âge adulte.	41
Figure 28 : Œuf (48 h après ponte)	42
Figure 30 : Incubateur (à gauche) et plaque 96 puits (à droite)	43

Liste des tableaux

Tableau 1 : Fréquence d'échantillonnage pour la calibration des membranes en PDMS pour le TCS et le TCC.....	15
Tableau 2 : Influence du pH sur le K _{sw} du TCS	18
Tableau 3 : Valeurs des constantes cinétiques et thermodynamiques évaluées par le modèle, paramètres de validation du modèle (MSE est l'erreur quadratique moyenne et EF l'efficacité du modèle)	20
Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques de quelques conservateurs de substitution des PB. M : masse molaire, T _E : température d'ébullition, P _t : point de fusion, K _{OW} : coefficient de partage octanol-eau, S : solubilité, P _{sat} : pression de vapeur saturante, K _H : constante de Henry	28
Tableau 5 : Concentrations maximales autorisées de certains conservateurs de substitution des parabènes dans les produits cosmétiques (CE n° 1223/2009).....	29
Tableau 6 : Bibliographie sur les méthodes analytiques permettant de quantifier les substituants dans les eaux ou les produits cosmétiques.....	31
Tableau 7 : Volume d'eau consommé par habitant, par type d'utilisation (en L/j/habitant), issu de Deshayes et al., 2015	35
Tableau 8 : Données de consommation de produits dans la population française d'après Ficheux et al. (2015, 2016) et concentration des échantillons d'eaux grises (% correspond au pourcentage d'utilisateurs dans la population considérée)	35
Tableau 9 : Paramètres mesurés sur les échantillons pour tester la répétabilité du protocole. Moyenne ± écart-type (coefficient de variation en %). n = 3 pour chaque type d'échantillon	36
Tableau 10 : Bioessais réalisés par Tronico VigiCell.....	37

Introduction

Ce livrable a pour objectif de présenter les méthodes chimiques et biologiques développées dans le projet Cosmet'eau pour évaluer l'impact des changements de pratiques dans le domaine de la consommation des produits cosmétiques sur la qualité des milieux récepteurs. Les résultats acquis en appliquant ces méthodes seront présentés en fin de projet dans le livrable 4.2, *Estimation des sources, des flux et des impacts de produits cosmétiques dans le milieu récepteur*.

Les changements de pratiques dont on parle, et dont l'approche sociologique sera présentée en détails dans le livrable 3, *Le processus d'alerte : de la création de l'alerte à sa diffusion*, concernent la prise de conscience par le grand public des dangers des parabènes suite à une publication scientifique (Darbre et al., 2004). Ainsi, les parabènes (PB) qui étaient présents dans plus de 80 % des produits cosmétiques en 2010 (Fernandez et al., 2012) sont devenus de moins en moins fréquents (Figure 1 A) avec la multiplication des mentions « sans parabène » et l'essor des produits biologiques (bio) dans le champ des cosmétiques, si bien qu'en 2013 seuls 23 % des produits commercialisés en France en contenaient (Ineris, 2015). Ce changement de pratiques concerne aussi bien les consommateurs, dont les choix sont de plus en plus motivés par des questions de santé, que les industriels du secteur pour qui la plus simple des stratégies a consisté à substituer les parabènes par d'autres conservateurs (Figure 1 B).

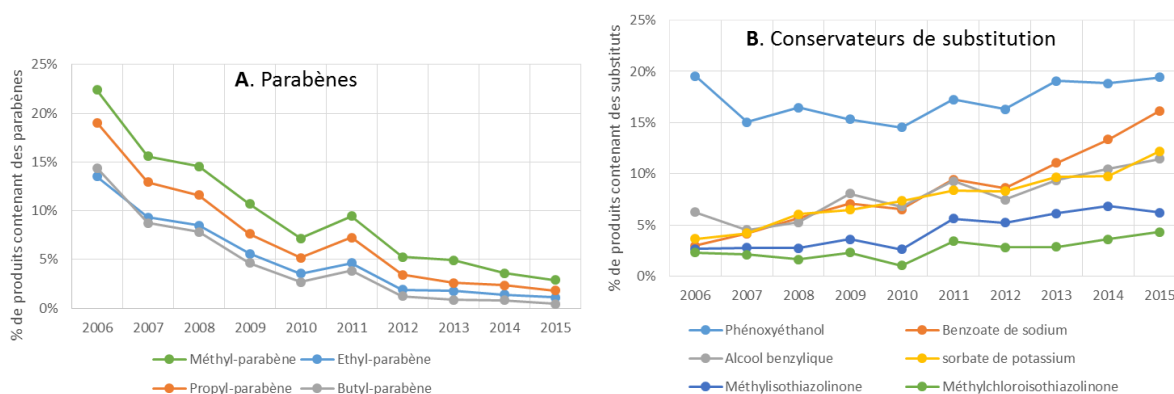


Figure 1 : Évolution des produits cosmétiques mis sur le marché contenant des parabènes (A) et contenant leurs substituts (B)

Afin d'évaluer l'impact de ces changements de pratiques sur la qualité des milieux aquatiques récepteurs, plusieurs stratégies et méthodes ont été développées et sont décrites dans les paragraphes suivants :

- Amélioration des méthodes de surveillance des milieux aquatiques : développement de l'échantillonnage passif des parabènes, triclosan (TCS) et triclocarban (TCC) par membranes polymériques (paragraphe 1).
- Description de l'évolution temporelle des flux de parabènes dans les eaux usées domestiques entre 2010 (Gasperi et al., 2014) et 2016 (paragraphe 2).

- Quantification des substituants aux parabènes dans les eaux usées par spectrométrie de masse haute résolution (paragraphe 3).
- Comparaison de l'impact des différentes pratiques de consommation par 3 approches (paragraphe 4) :
 - Une approche théorique comparant l'écotoxicité et l'occurrence des différentes substances (parabènes et substituants) (paragraphe 4.1).
 - Une approche globale consistant à réaliser des bioessais sur des eaux grises synthétiques contenant des produits cosmétiques avec parabènes, sans parabène et bio (paragraphe 4.2).
 - Une approche par substances comparant la toxicité des différentes substances sur un organisme aquatique modèle (poisson zèbre ou zebra fish) (paragraphe 4.3).

1 Échantillonnage passif du triclosan et du triclocarban dans les milieux aquatiques

L'objectif de cette partie est de développer et optimiser l'échantillonnage passif du triclosan et du triclocarban dans les eaux urbaines. Étant donnée la différence d'hydrophobicité entre les parabènes d'une part, et le triclosan et triclocarban d'autre part, un seul type d'échantillonneur passif ne peut pas être utilisé pour toutes les molécules.

En se basant sur l'état de l'art (Bressy et al., 2015) et sur l'expertise du Leesu acquise sur l'échantillonnage passif des molécules hydrophobes, en particulier dans le cadre du projet Emestox financé par l'Agence Nationale de la Recherche (Emestox, 2013), nous avons choisi d'utiliser les membranes polymériques et d'adapter le protocole actuel au triclosan et triclocarban.

Le développement s'est déroulé en 3 étapes : d'abord le développement du protocole de nettoyage, dopage et extraction des membranes polymériques, ensuite la calibration en laboratoire des échanges entre l'eau et les membranes, et enfin l'application *in situ* des membranes.

1.1 Développement du protocole de nettoyage, dopage et extraction des membranes

Le développement du protocole vise à choisir le matériau de la membrane, la taille de la membrane, les traceurs internes et les conditions de nettoyage, de dopage et d'extraction.

1.1.1 Méthodologie suivie

Les traceurs internes, appelés PRC dans la littérature (Huckins et al., 2002), ont été sélectionnés pour avoir des propriétés physico-chimiques proches des molécules d'intérêts mais sans être présentes dans l'environnement. Il s'agit de molécules deutérées qui jouent le rôle d'étalons d'extraction dans la méthode d'analyse des échantillons classiques ponctuels : le propylparabène-d4 (PrPd4) et le triclosan-d3 (TCSd3).

Différentes conditions ont été testées sur les molécules d'intérêts et sur les traceurs choisis : deux matériaux de membrane (Low Density Polyéthylène (LDPE) et le polydiméthylsiloxane (PDMS)), plusieurs solvants (méthanol (MeOH), dichlorométhane (DCM), acétone (Ac)) et durées de rinçage/dialyse (24 h et 48h), plusieurs solvants (MeOH ou eau) et durées de dopage. Les tests réalisés sont décrits en Figure 2 et Figure 3.

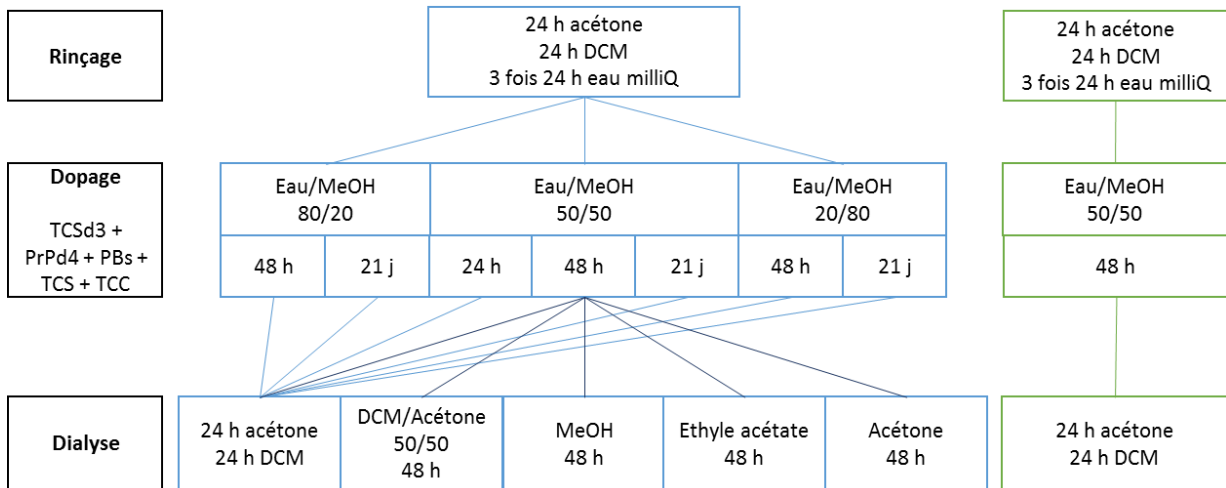


Figure 2 : Premiers tests sur les membranes LDPE (en bleu) et PDMS (en vert)

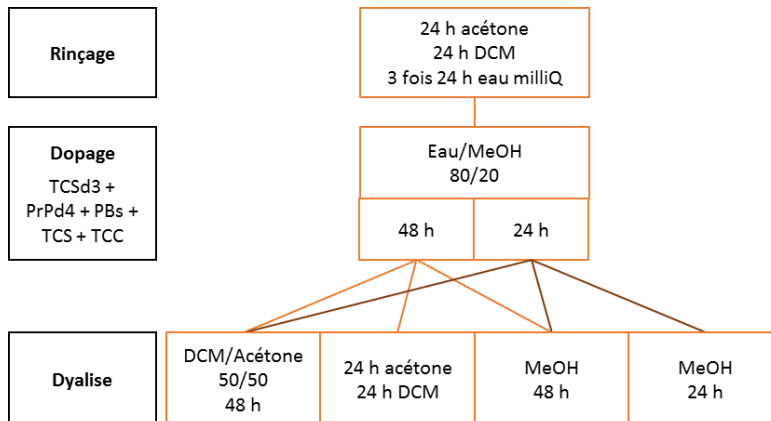


Figure 3 : Seconds tests sur les membranes LDPE et PDMS

1.1.2 Résultats des tests de développement

1.1.2.1 Choix du type de membrane

Afin de choisir le matériau optimum, le pourcentage de récupération après dopage a été comparé entre le LDPE et le PDMS (avec un dopage pendant 24 h dans du MeOH/eau 20/80 et une dialyse au MeOH pendant 24 h). Les résultats sont donnés en Figure 4. Les pourcentages de récupération du PDMS sont supérieurs d'environ 30 % aux pourcentages de récupération dans le LDPE et c'est donc ce matériau qui a été sélectionné pour la suite.

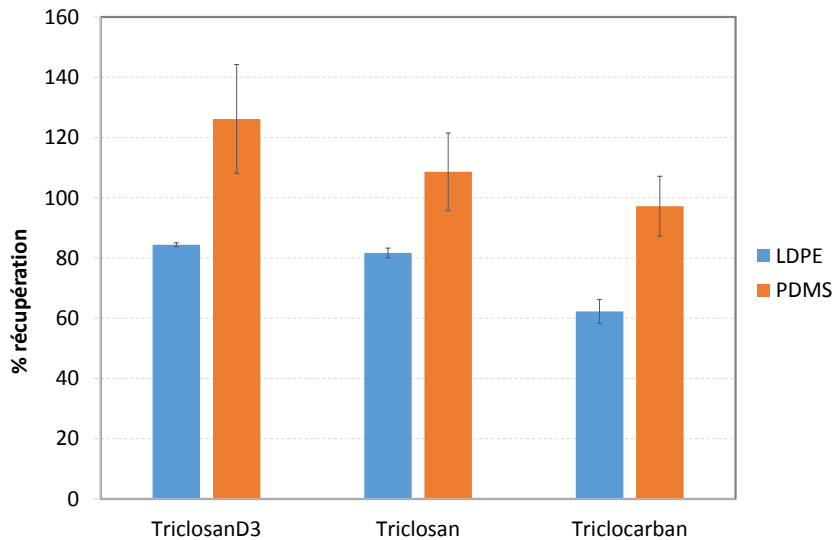


Figure 4 : Comparaison de la capacité d'accumulation entre le LDPE et le PDMS (dopage pendant 24 h dans un mélange MeOH/eau - 20/80)

1.1.2.2 Choix du solvant et de la durée de dopage

La littérature proposait deux solvants de dopage : MeOH/eau 80/20 (Sacks and Lohmann, 2011) et MeOH/eau 20/80 (Perron et al., 2013) avec des durées longues de dopage (21 à 28 jours). Notre expérience avec les HAP (Emestox, 2013) montrait que quelques heures de dopage suffisaient pour obtenir des rendements de dopage importants et qu'une faible proportion de solvant organique était plus efficace qu'une proportion importante. Nous avons donc testé plusieurs durées de dopage (24 h, 48 h et 21 jours) et plusieurs proportions de MeOH/eau (80/20, 50/50 et 20/80). Les rendements de dopage sont comparés en Figure 5.

Comme montré dans le projet Emestox et contrairement à la publication de (Sacks and Lohmann (2011), la proportion 80/20 de solvant MeOH/eau est beaucoup plus efficace (rendement entre 70 et 100 %) que les proportions 50/50 et 20/80 (moins de 10 % de rendement). D'autre part, comme le montre la Figure 5, 24 h suffisent pour obtenir autour de 100 % de rendement de dopage.

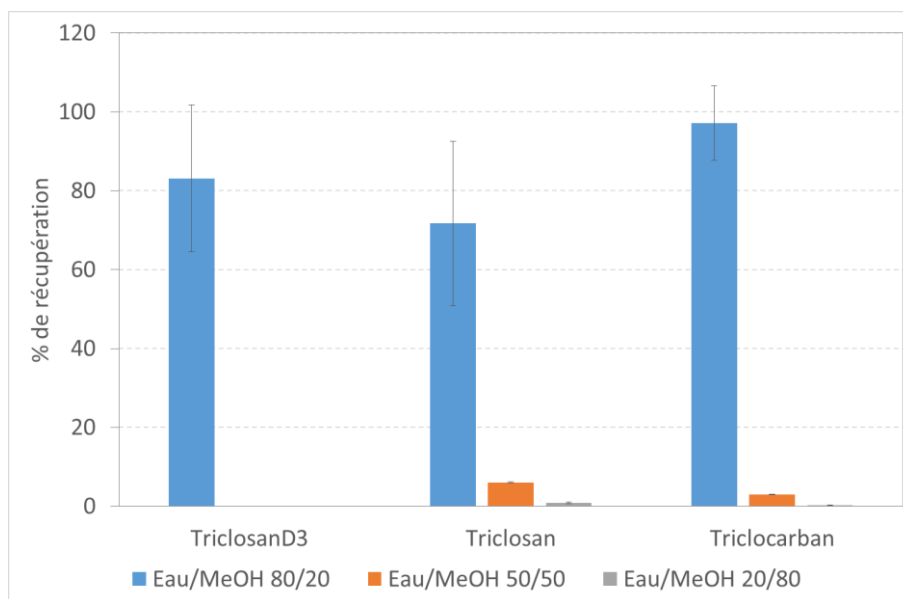


Figure 5 : Comparaison des rendements de dopage en fonction du solvant de dopage (dopage pendant 24 h)

1.1.2.3 Choix du solvant et de la durée de la dialyse

La Figure 6 permet de comparer les pourcentages de récupération en fonction du solvant (MeOH ou DCM/Ac) de dialyse et de sa durée (24 h ou 48 h). Quelle que soit la condition considérée, les taux de récupération sont équivalents et autour de 100 %. Nous avons commencé à travailler avec une dialyse au MeOH pendant 24 h. Des suspicions de colmatage de la colonne chromatographique lors de l'analyse en UPLC-MSMS nous ont ensuite orientés vers le mélange DCM/Ac moins agressif pour le PDMS.

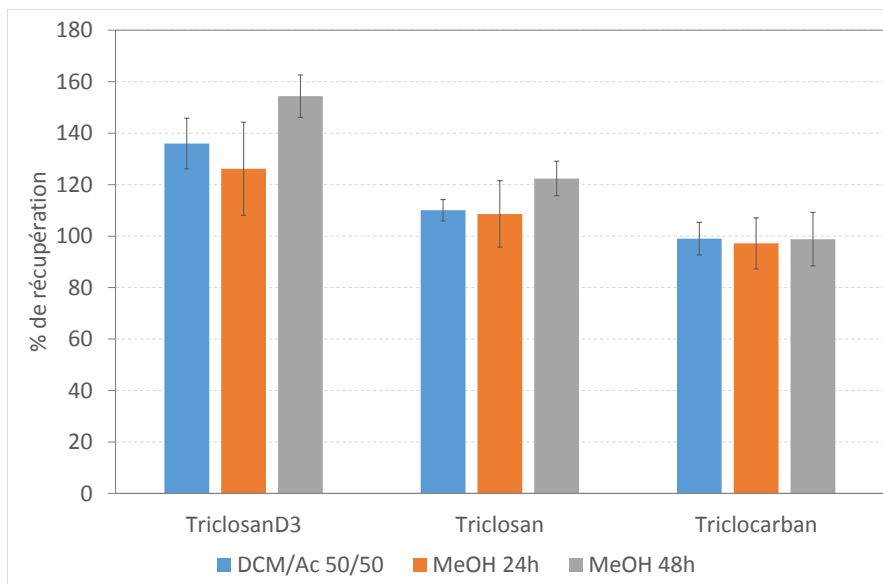


Figure 6 : Comparaison des pourcentages de récupération en fonction du solvant et du temps de dialyse

1.1.3 Protocole en routine

À la suite de ces deux séries de tests, un protocole a été défini. Les membranes en PDMS ont été choisies. Les PRC sont le TCSd3 et le PrPd4. Chaque étape de préparation et de dialyse sont effectuées sur table d'agitation à 175 rpm dans un volume correspondant à 1 mL/cm² de membrane. Après découpage des membranes à la taille souhaitée, ces dernières sont rincées dans du méthanol pendant 24 h puis dans de l'eau ultra-pure pendant 72h en changeant l'eau toutes les 24 h. Les membranes sont ensuite dopées en PRC dans un mélange eau/MeOH 80/20 pendant 24 h. Elles sont enfin rincées 3 fois 1 h dans de l'eau ultra-pure et conservées au congélateur. Après exposition en laboratoire ou sur le terrain, et nettoyage éventuel au papier Kimtech, les membranes sont plongées dans des flacons de 100 mL en verre ambré dans 90 mL d'un mélange Ac/DCM (50/50 v/v) pendant 24 h à 200 rpm. Les étalons internes de quantification sont ajoutés et les dialysats sont évaporés à sec sous flux d'azote, repris dans 1 mL de phase mobile, filtrés sur filtres « seringue » de porosité 0,2 µm avant analyse par UPLC-MSMS.

Les rendements de la méthode dopage/dialyse sont compris entre 75 et 120 %, les blancs protocoles ne présentent aucune contamination (< limite de quantification) et les répétabilités réalisées ont un coefficient de variation inférieur à 20 %.

1.2 Calibration en laboratoire

La calibration en laboratoire a été réalisée dans un pilote fermé développé dans le cadre du projet Emestox (Emestox, 2013) (voir Figure 7). Le principe est de suivre les cinétiques d'accumulation et de désorption des substances entre des membranes dopées qui servent de source et des membranes propres exposées en même temps dans l'eau du pilote. Pour chaque temps de la cinétique, une membrane propre et une membrane dopée sont retirées du pilote et analysées.

1.2.1 Modèle théorique

Les constantes cinétiques sont estimées en ajustant un modèle aux mesures expérimentales (teneurs dans les membranes dopées et propres à chaque prélèvement et concentration dans l'eau à la fin de l'expérience). Le modèle décrivant la dynamique du polluant dans une membrane est basé sur des échanges cinétiques du premier ordre. Les équations 10, 11, 12 décrivent le modèle utilisé :

$$\frac{dC_s}{dt} = -k_e C_s + k_u C_w \quad \text{Équation 1}$$

$$\frac{dC_c}{dt} = -k_e C_c + k_u C_w \quad \text{Équation 2}$$

$$\frac{dC_w}{dt} = k_e C_s + k_e C_c - 2k_u C_w - k_p C_w \quad \text{Équation 3}$$

Avec C_s , C_c , C_w les concentrations en $\mu\text{g/L}$ pour la membrane dopée, la membrane propre et l'eau respectivement, k_e et k_u les constantes d'élimination et d'accumulation en j^{-1} pour la membrane, et k_p une constante de perte permettant de modéliser d'éventuelles pertes dans le pilote lors de l'expérimentation (évaporation lors de l'ouverture du pilote pour enlever des membranes ou adsorption sur les matériaux).

L'ajustement des données expérimentales au modèle a été réalisé avec le package FME de l'environnement R version 3.1.1. Cet outil minimise une fonction objectif, qui est la somme des résidus pondérés au carré entre le modèle et les mesures expérimentales (Soetaert et al., 2010).

1.2.2 Description du pilote et protocole expérimental

Le pilote est une cuve en verre en forme de canal annulaire (le diamètre extérieur de la cuve est de 270 mm et le canal annulaire a une largeur de 40 mm). Un carrousel en acier inoxydable supportant les membranes est entraîné à une vitesse constante dans la cuve remplie d'eau par un moteur. Le moteur et le carrousel sont reliés par un accouplement flexible. Le système est étanche grâce à un joint en caoutchouc et des vis. Une circulation d'eau thermostatée dans la paroi de la cuve permet de contrôler la température. La conception et la validation de ce pilote sont décrits dans le livrable du projet Emestox (Emestox 2013). Des photos du pilote et du support pour les membranes sont données Figure 7.

Plusieurs essais de cinétique ont été réalisés. Le premier essai, préliminaire, visait à déterminer l'ordre de grandeur nécessaire au système pour atteindre l'équilibre. Le deuxième correspond à une cinétique simplifiée à plusieurs pH. Le troisième essai correspond à la cinétique finale. Pour chaque essai, le même nombre de membranes en PDMS dopées (de taille 9,6 cm x 1 cm x 500 μm) et non dopées sont placées dans le pilote en alternant une rangée de membranes dopées et une rangée de membranes non dopées. Les membranes sont

plongées dans de l'eau d'Évian à un pH et à une température fixés. Le pilote tourne à une vitesse de 40 tours/minute ce qui correspond la vitesse linéaire moyenne annuelle de la Seine qui est de 0,4 m/s. Une membrane propre et une membrane dopée sont enlevées à chaque point de cinétique. Chaque membrane enlevée est remplacée par une membrane en acier inoxydable de même taille afin de ne pas perturber l'hydrodynamique. À la fin de la cinétique, l'eau du pilote est analysée pour connaître la concentration en TCS et TCC dans l'eau. Afin de déterminer la teneur initiale en composés, 5 membranes dopées et 5 membranes propres sont extraites à $t=0$. Le Tableau 1 présente la fréquence d'échantillonnage suivie pour les deux essais.

- Essai préliminaire pour déterminer la durée optimale de cinétique

Cinq membranes ont été dopées à des concentrations en TCC, TCS, TCSd3, PB et PrPd4 respectivement de 100, 500, 320, 100 et 10 $\mu\text{g/L}$. Elles ont été exposées avec cinq membranes propres (placées en vis-à-vis, les autres emplacements étant occupés par des membranes en inox) dans de l'eau d'Évian à un pH de 7,7 et à une température moyenne de 20,7 °C

- Influence du pH

La même expérimentation que pour l'essai préliminaire a été réalisée à pH acide (3) et pH basique (10) afin d'évaluer l'impact du pH sur la cinétique d'échange et la constante de partage PDMS / eau.

- Cinétique complète

15 membranes dopées et 15 membranes propres sont placées de manière alternée sur le portoir en inox (6 rangées de 5 membranes : 3 pour les membranes dopées et 3 pour les propres) dans de l'eau d'Évian à un pH de 7,7 et à une température moyenne de 20,7 °C



Figure 7 : Pilote de calibration des membranes polymériques

Tableau 1 : Fréquence d'échantillonnage pour la calibration des membranes en PDMS pour le TCS et le TCC

Essai	Temps (j)															
	Essai préliminaire	0.00	0.29	1	2	7										
Cinétique complète	0.00	0.17	0.32	0.95	1.12	1.28	1.94	2.12	2.28	2.96	3.20	6.18	7.18	9.18	9.95	12.95

1.2.3 Résultats de l'essai préliminaire

Les Figure 8 à Figure 16 présentent les résultats de cet essai préliminaire qui visait à choisir la durée d'étude de la cinétique et à comparer le comportement des différentes substances.

L'équilibre est atteint au bout d'une semaine dans le cas du TCS et du TCSd3 avec des concentrations équivalentes dans les membranes dopées et non dopées. Le TCC n'a pas atteint l'équilibre au bout d'une semaine avec une décroissance plus lente que pour le TCS. Ceci peut s'expliquer par la valeur du K_{ow} du TCC. En effet, ce dernier est légèrement plus hydrophobe que le TCS et passe donc de la membrane à l'eau plus lentement. Dans le cas du MeP et de l'EtP, les concentrations dans les membranes non dopées et dans les membranes dopées après quelques heures d'exposition dans l'eau se trouvent sous les LOQ. Une désorption rapide de la concentration dans les membranes dopées a été observée. Ces deux composés s'absorbent donc peu dans les membranes. Dans le cas des autres PB, l'absorption dans les membranes dopées et la désorption depuis les membranes non dopées sont observées. L'équilibre pour ces composés est atteint en moins d'une semaine. Cependant, le PrPd4 n'a pas pu être quantifié dans les membranes dopées. Dans le cas des membranes PDMS, l'échantillonneur passif peut être utilisé comme un outil intégratif sur une période d'une semaine pour le TCS et le TCC. Pour les parabènes, il ne pourra pas être utilisé comme intégrateur, mais éventuellement comme une mesure ponctuelle de la fraction dissoute dans l'eau.

Au vu de ces résultats, il a été décidé d'étudier les cinétiques du TCS, TCSd3 et TCC sur 12 jours afin de pouvoir calibrer leurs constantes d'échange.

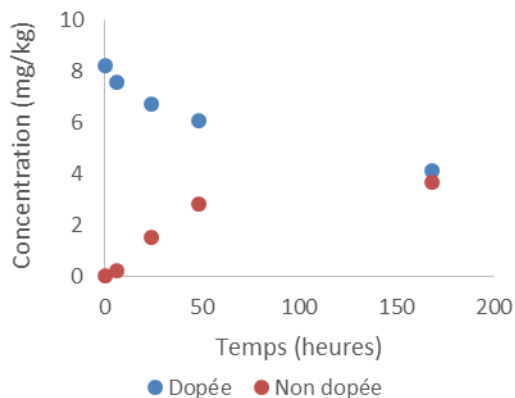


Figure 8 : Cinétiques de désorption et d'absorption du TCS

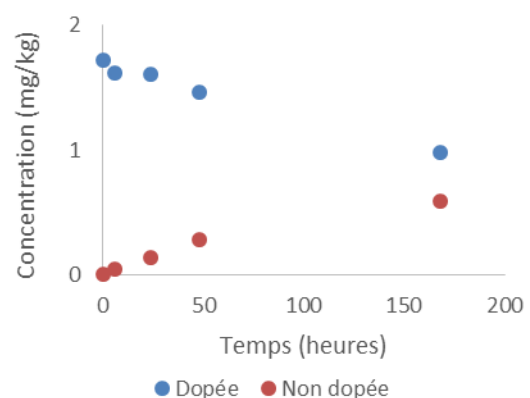


Figure 9 : Cinétiques de désorption et d'absorption du TCC

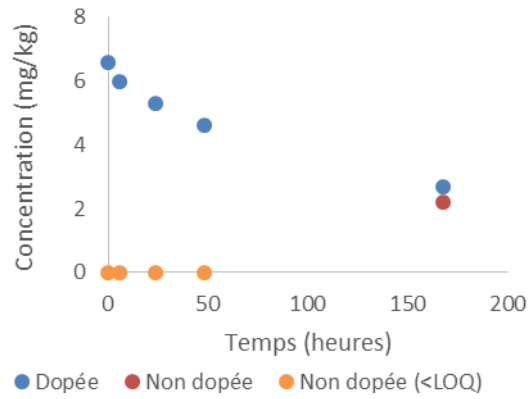


Figure 10 : Cinétiques de désorption et d'absorption du TCSD3

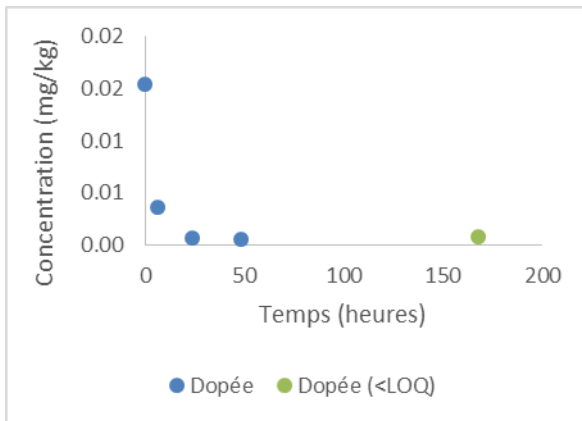


Figure 11 : Cinétiques de désorption et d'absorption du MeP

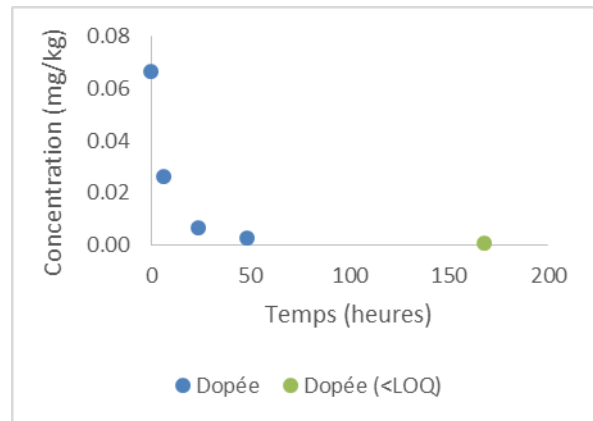


Figure 12 : Cinétiques de désorption et d'absorption de l'EtP

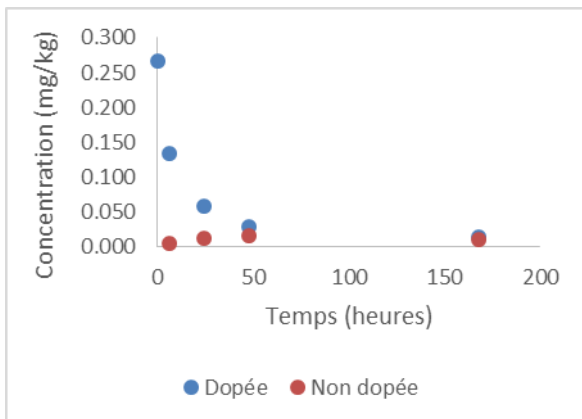


Figure 13 : Cinétiques de désorption et d'absorption du PrP

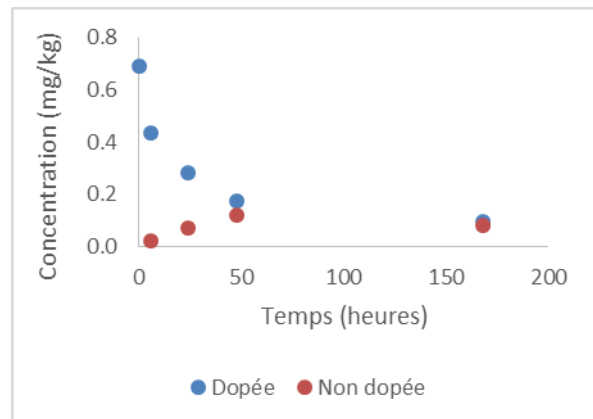


Figure 14 : Cinétiques de désorption et d'absorption du BuP

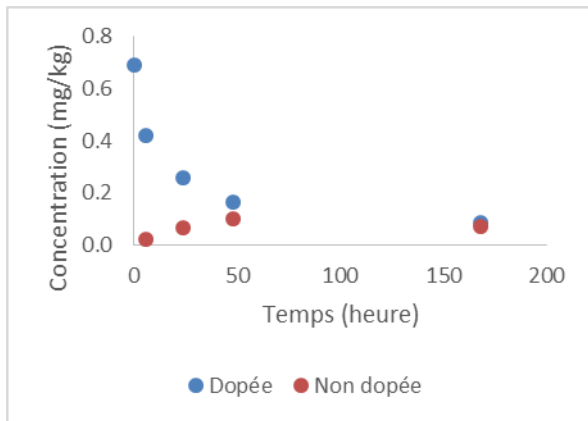


Figure 15 : Cinétiques de désorption et d'absorption du iBuP

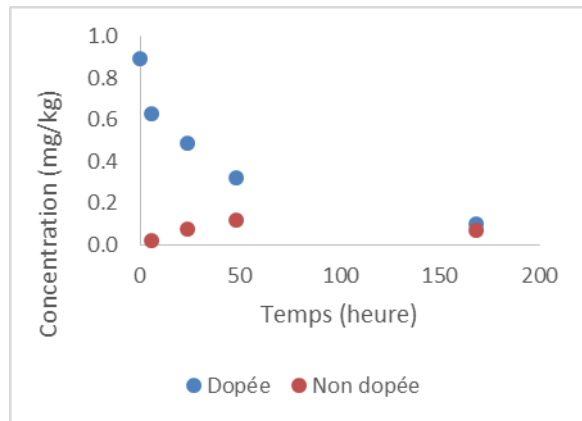


Figure 16 : Cinétiques de désorption et d'absorption du BzP

1.2.4 Influence du pH

Il a été vu dans l'état de l'art que la forme ionisée du TCS ($pK_a=8,14$) est susceptible d'avoir un coefficient de partage plus faible que celui de la forme neutre et donc impacter directement la capacité d'accumulation dans les échantillonneurs passifs (Kibbey et al., 2007). Afin de déterminer si le pH a une influence sur la cinétique des composés, trois cinétiques ont été effectuées à 3 pH (3, 7,7 et 10).

Les cinétiques à ces 3 pH sont représentées en Figure 17. Les constantes d'équilibre estimées à partir des concentrations mesurées dans les membranes et dans l'eau à $t=7$ jours sont données dans le Tableau 2. Ces résultats montrent que le pH a une influence à la fois sur la cinétique d'échange et sur la thermodynamique. Les points expérimentaux n'étant pas assez nombreux pour calibrer la cinétique d'échange, seuls des commentaires qualitatifs peuvent être faits. D'après la Figure 17, au plus le pH est élevé, au plus l'équilibre est rapidement atteint (1 jour à pH basique contre environ 7 jours à pH neutre et acide). En effet, à pH basique le TCS est ionisé et donc plus soluble, ce qui accélère le transfert et la diffusion dans l'eau, et donc les échanges membranes/eau. Ces résultats avaient été observés dans le projet Emestox pour les HAP dont la vitesse d'échange augmente lorsque leur hydrophobicité diminue (Emestox, 2013). Le pH de l'eau modifie également le coefficient de partage membrane/Eau (K_{sw}) qui augmente lorsque le pH diminue, en lien également avec la solubilité décroissante du TCS à pH acide. La valeur du K_{sw} augmente d'un facteur 50 entre l'expérimentation à pH basique (200) et à pH acide (9 400).

Tableau 2 : Influence du pH sur le K_{sw} du TCS

TCS	acide	neutre	basique
Estimation du K_{sw}	9400	3800	200

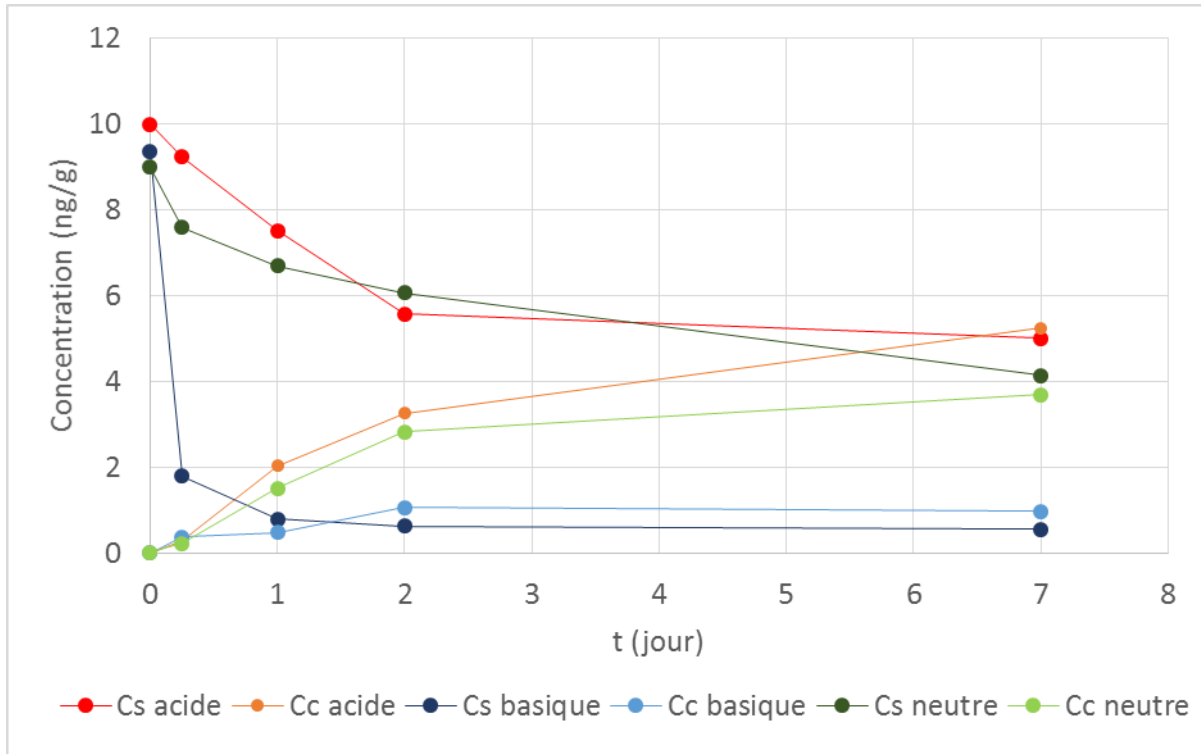


Figure 17 : Influence du pH sur les cinétiques d'échange entre le PDMS et l'eau pour le TCS (Cs la teneur dans la membrane dopée, Cc la teneur dans la membrane propre)

1.2.5 Calibration des constantes cinétiques et thermodynamiques

Les cinétiques d'accumulation et de désorption ont pu être modélisées pour le TCS, le TCSd3 et le TCC. Les résultats expérimentaux et modélisés sont donnés Figure 18 à Figure 20. Les valeurs modélisées de k_u , k_e et K_{SW} sont données dans le Tableau 3 avec leur écart-type. Pour ces trois substances, le coefficient de perte (k_p voir paragraphe 1.2.1) était égal à 0.

Analyse de sensibilité du modèle

Afin d'évaluer la pertinence de notre modèle, une analyse de sensibilité a été conduite pour voir comment les concentrations mesurées varient en fonction des constantes k_u et k_e . Pour cela, des données de concentrations ont été simulées par le modèle en faisant varier k_u et k_e dans des gammes proches de celles trouvées pour le TCS et le TCC :

- $0,1 < k_e < 1$ et $100 < k_u < 1000$
- Entre leur valeur calibrée moins deux fois leur écart-type et leur valeur calibrée plus deux fois leur écart-type (ce qui correspond à une variation de plus ou moins 15 % environ).

Les graphiques représentant la variation de Cs, Cc et Cw lorsque l'on fait varier k_e ou k_u sont présentés en Annexe 1. La Figure supplémentaire 1 montre que Cs, Cc et Cw sont sensibles aux variations de k_e tandis que la Figure supplémentaire 2 montre que seule Cw est sensible aux variations de k_u . Ce résultat peut être retrouvé théoriquement en résolvant analytiquement les équations du modèle (Cf. Annexe 1).

Ces résultats théoriques et expérimentaux mettent en lumière une limite de notre méthode : les variations de Cs et Cc permettent de caler expérimentalement la valeur de k_e mais k_u n'est

en fait calé qu'à partir de la concentration mesurée dans l'eau à la fin de l'expérimentation qui est une mesure unique sur laquelle il y a une forte incertitude.

Description des résultats

Comme observé pour les cinétiques courtes, les cinétiques du TCS, TCC et TCSd3 atteignent l'équilibre en moins de 12 jours : entre 5 et 6 jours pour le TCS et le TCSd3, et en environ 12 jours pour le TCC, en lien avec leur différence d'hydrophobicité. Pour chacune des trois substances, les constantes ont pu être modélisées (Cf. Tableau 3). Les constantes évaluées sont proches pour le TCS et le TCSd3 dont les formules chimiques sont similaires aux atomes de deutérium près. En revanche, le k_e et le K_{sw} du TCC sont significativement différents : environ 3 fois plus grand pour le K_{sw} , ce qui est du même ordre de grandeur que la différence de leur K_{ow} , et environ 2,4 fois plus faible pour le k_e ce qui traduit une cinétique plus lente comme le montrent les graphiques de cinétique d'échange.

Il est difficile de comparer les constantes évaluées à celles de la littérature étant donné que le PDMS n'a pas été calibré pour ces substances jusqu'à présent (voir livrable 1.3 (Bressy et al., 2015)). Il est seulement possible de comparer le $\log K_{sw}$ du triclosan dans le PDMS ($\log K_{sw}=3,63\pm 0,03$ cette étude) avec le $\log K_{sw}$ évalué par Perron et al. (2013) dans le LDPE ($\log K_{sw}=2,44$), dans le POM ($\log K_{sw}=3,79$) et dans des fibres de PDMS ($\log K_{sw}=4,06$).

Tableau 3 : Valeurs des constantes cinétiques et thermodynamiques évaluées par le modèle, paramètres de validation du modèle (MSE est l'erreur quadratique moyenne et EF l'efficacité du modèle)

	k_u (j^{-1})	k_e (j^{-1})	K_{sw}	MSE	EF
TCSd3	2737 ± 226	0.777 ± 0.055	3521 ± 244	0,0011	0,93
TCS	3263 ± 239	0.756 ± 0.046	4315 ± 261	0,454	0,86
TCC	3370 ± 157	0.307 ± 0.031	10970 ± 190	0,0344	0,76

Validation des modèles

Différents paramètres ont été utilisés pour valider et caractériser les calibrations effectuées : l'erreur du modèle exprimée sous forme d'erreur relative et représentée en Figure 21, Figure 22 et Figure 23, l'erreur quadratique moyenne (MSE) et l'efficacité (EF) du modèle dont les expressions sont données ci-dessous. Les valeurs de MSE et EF sont données dans le Tableau 3.

$$MSE = \frac{1}{N} \sum_1^N (C_{obs} - C_{mes})^2 \quad \text{Équation 4}$$

$$EF = 1 - \frac{\sum_1^N (C_{obs} - C_{mes})^2}{\sum_1^N (C_{obs} - C_{moy})^2} \quad \text{Équation 5}$$

L'efficacité du modèle est comprise entre 0,76 et 0,93 (il tend vers 1 pour un modèle parfait) prouvant une bonne représentation des données expérimentales par le modèle. Les erreurs relatives sont comprises entre -20 % et 20 % et aléatoirement distribuées pour le TCSd3. Elles sont plus importantes (jusqu'à 50 %) pour le TCS et le TCC, et moins bien distribuées. Il est possible pour ces substances que la concentration dans l'eau C_w ait été mesurée avec une plus grande incertitude entraînant une erreur plus importante sur k_u pour le TCS et le TCC que pour le TCSd3.

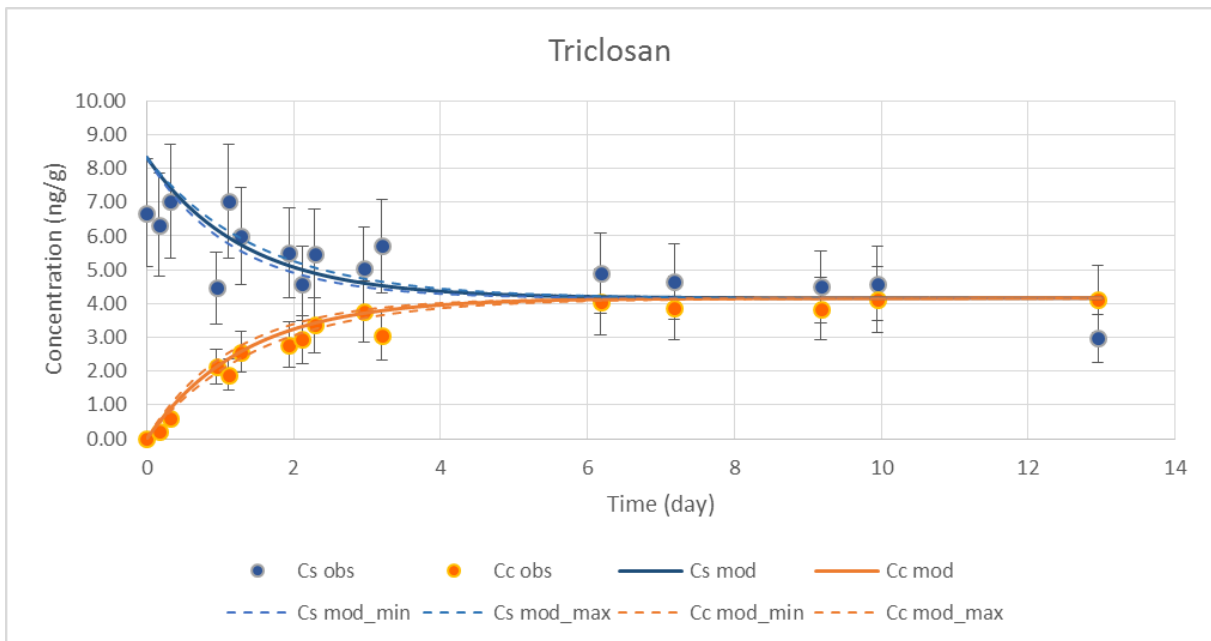


Figure 18 : Cinétique d'accumulation et de désorption du TCS, comparaison des données expérimentales et modélisées (la mention « obs » concerne les données expérimentales, la mention « mod » concerne les données modélisées, les mentions mod-min et mod-max concernent les analyses de sensibilités sur k_e)

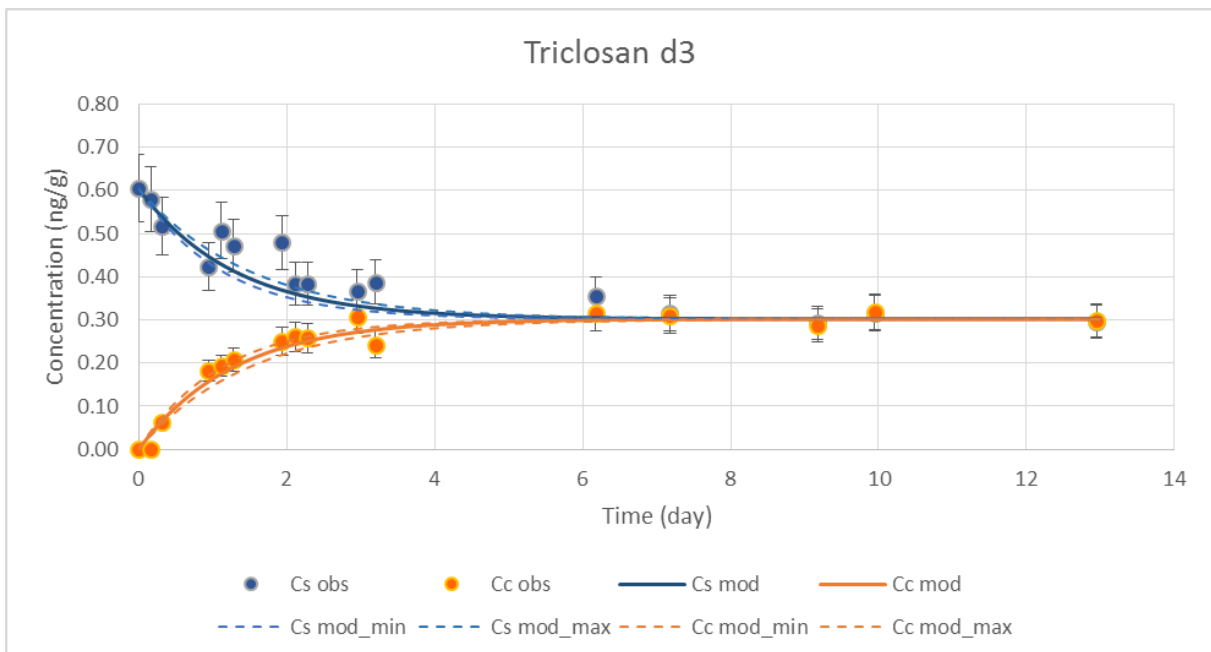


Figure 19 : Cinétique d'accumulation et de désorption du TCS d3, comparaison des données expérimentales et modélisées (la mention « obs » concerne les données expérimentales, la mention « mod » concerne les données modélisées, les mentions mod-min et mod-max concernent les analyses de sensibilités sur k_e)

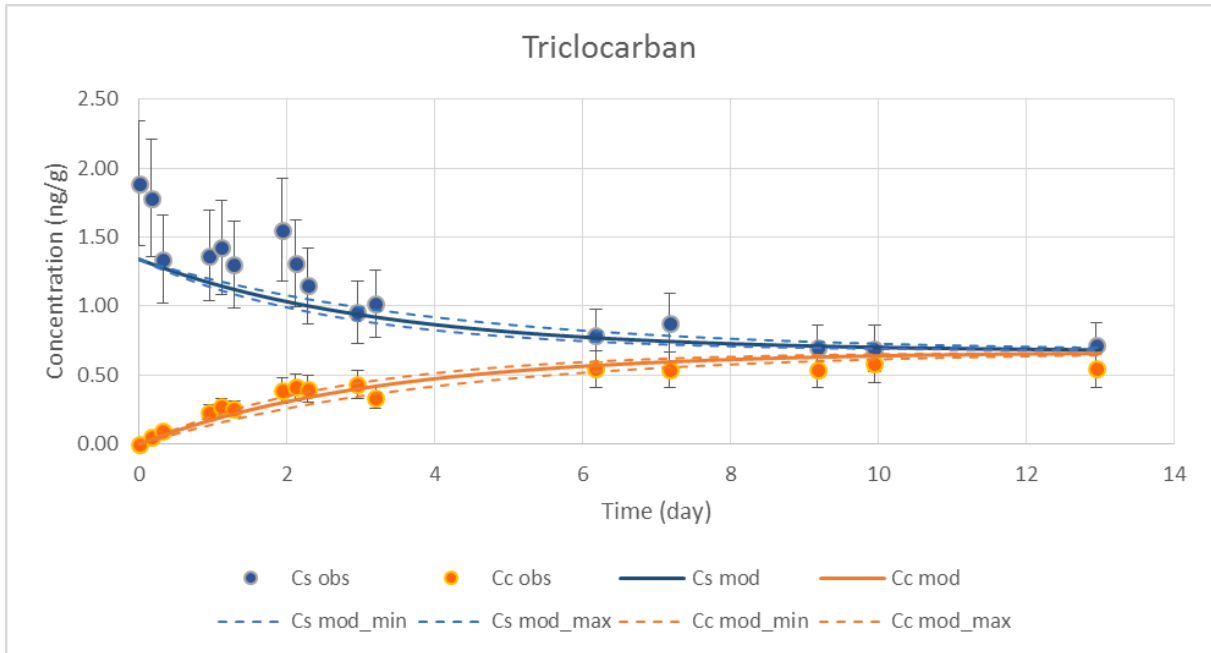


Figure 20 : Cinétique d'accumulation et de désorption du TCC, comparaison des données expérimentales et modélisées (la mention « obs » concerne les données expérimentales, la mention « mod » concerne les données modélisées, les mentions mod-min et mod-max concernent les analyses de sensibilités sur k_e)

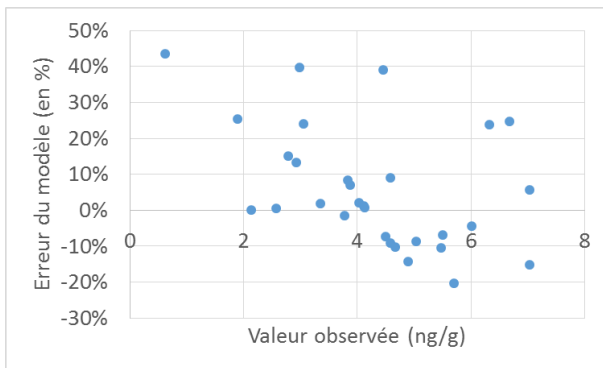


Figure 21 : Erreur relative du modèle pour le TCS

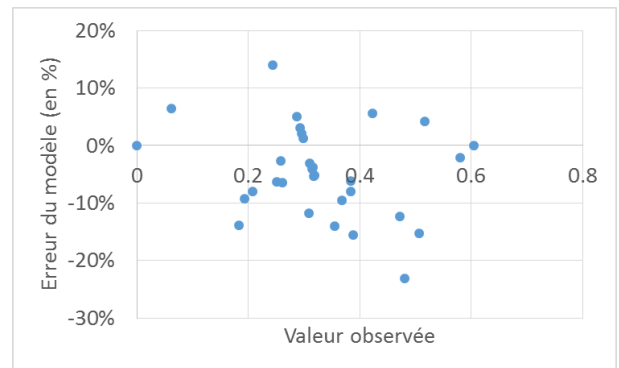


Figure 22 : Erreur relative du modèle pour le TCSd3

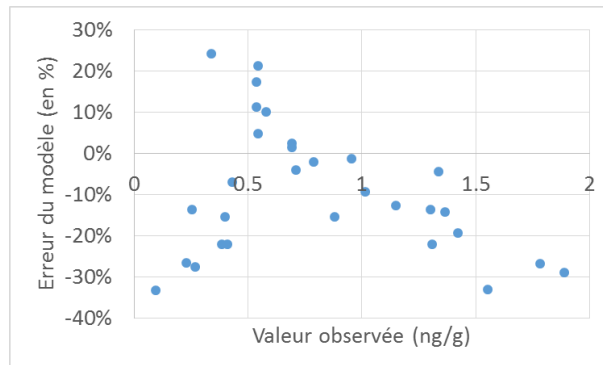


Figure 23 : Erreur relative du modèle pour le TCC

1.3 Application en Seine

1.3.1 Exposition *in situ*

Après le nettoyage décrit au paragraphe 1.1.3, les membranes sont dopées en PRC (à une teneur d'environ 0,06 mg/kg) dans un mélange eau/méthanol 80/20 pendant 24 h. Elles sont enfin rincées 3 fois 1 h dans de l'eau ultra-pure et conservées au congélateur. Les membranes sont exposées sur un portoir en inox dans l'eau sur le site d'échantillonnage à environ 1 m de profondeur. Après 7 jours d'exposition, chaque membrane est récupérée, nettoyée délicatement au papier Kimtech pour enlever le biofilm et plongée sur place dans des flacons de 100 mL en verre ambré dans 90 mL d'un mélange Ac/DCM (50/50 v/v) pendant 24 h à 200 rpm. Des blancs de laboratoire et de terrain sont également intégrés à la procédure. Des tests d'exposition ont été réalisés *in situ* en 2015 et 2016. Les premiers résultats montrent que le TCS et le TCC s'adsorbent dans les membranes ce qui prouve l'intérêt de l'outil. Le taux de récupération du PRC TCSd3 (de l'ordre de 80 % après 7 jours) montre que l'équilibre n'est pas encore atteint et qu'on est toujours dans la phase intégratrice.

1.3.2 Calcul des concentrations dans l'eau à partir des concentrations accumulées

Les concentrations moyennes dans l'eau pendant la durée d'exposition sont estimées à partir des teneurs de contaminants accumulés dans les membranes. Les constantes cinétiques et d'équilibre déterminées en laboratoire sont corrigées à partir de l'élimination des PRC au cours du temps (Emestox, 2013).

L'élimination des PRC pendant la durée d'exposition t permet d'estimer les constantes d'élimination des PRC *in situ* k_{ePRC}^{field} :

$$k_{ePRC}^{field} = -\frac{\ln(C_{PRC}(t)/C_{PRC}(0))}{t} \quad \text{Équation 6}$$

Où $C_{PRC}(t)$ est la concentration en PRC dans la membrane au temps t en ng/L.

Le taux d'échantillonnage des PRC est calculé selon l'équation 4 :

$$R_{sPRC}^{field} = V_s K_{sw} k_{ePRC}^{field} \quad \text{Équation 7}$$

Les taux d'échantillonnage R_s sont supposés dépendre du composé i et de la condition j suivant l'équation suivante (Booij et al. 1998 ; Huckins et al. 2002) :

$$R_i^j = \alpha_i \beta_j \quad \text{Équation 8}$$

Où α_i et β_j sont des coefficients théoriques uniquement dépendants soit du composé i soit de la condition j .

Donc en combinant l'équation 8 pour le PRC, le composé et les conditions *laboratoire* et *in situ*, on obtient :

$$\frac{R_{sPRC}^{field}}{R_{scomp}^{field}} = \frac{R_{sPRC}^{lab}}{R_{scomp}^{lab}} \quad \text{Équation 9}$$

Après avoir corrigé le taux d'échantillonnage du composé d'intérêt, la concentration moyenne dans l'eau pendant la durée d'exposition peut alors être estimée selon l'équation :

$$C_w = \frac{C_s}{K_{sw} \left[1 - \exp\left(-\frac{R_{scomp}^{field} \cdot t}{K_{sw} V_s}\right) \right]}$$

Équation 10

2 Analyse de l'évolution temporelle des concentrations en parabènes dans les eaux usées

Des données de concentrations en parabènes dans les eaux usées domestiques parisiennes ont été acquises au Leesu en 2010 dans le cadre de la thèse de Darine Geara-Matta (2012). Ces eaux sont considérées comme représentatives des pratiques de consommation puisqu'elles intègrent les eaux domestiques d'environ 9 millions d'habitants. Nous considérons que ces données représentent un état initial avant les changements de pratiques.

Les mêmes points sont échantillonnés entre mi 2015 et mi 2017 avec les mêmes méthodes d'échantillonnage et d'analyse afin de pouvoir comparer les flux de parabènes et évaluer si ces flux dans les eaux usées ont évolué depuis les changements de pratiques dans la consommation de produits cosmétiques.

2.1.1 Description des sites et des campagnes d'échantillonnage

Le réseau d'assainissement parisien étant unitaire et rassemblant ainsi eaux pluviales et eaux usées, les échantillonnages des eaux usées brutes ont été effectués par temps sec, par les équipes du SIAAP au niveau de sept émissaires de la région parisienne (Figure 24). Il s'agit d'échantillons moyens prélevés sur 24 h par des préleveurs automatiques (Buhler Montec Lange 4011) asservis au débit.

Cinq émissaires alimentent la STEU Seine-Aval : Saint-Denis Achères (SDA), Clichy Achères via Argenteuil (CAA), Clichy Achères via Bezons (CAB), Sèvres Achères via Nanterre (SAN), Sèvres Achères via Rueil (SAR). Les deux derniers sont les émissaires alimentant Seine-Amont (SAM) et Marne-Aval (MAV).

En raison de travaux sur la station d'épuration Seine-Aval, tous les émissaires ne sont pas tout le temps en activité. Les échantillonnages se feront donc sur tous les émissaires en fonctionnement au moment de la campagne et les flux moyens seront évalués en tenant compte des volumes transitant par chaque émissaire au cours du prélèvement.

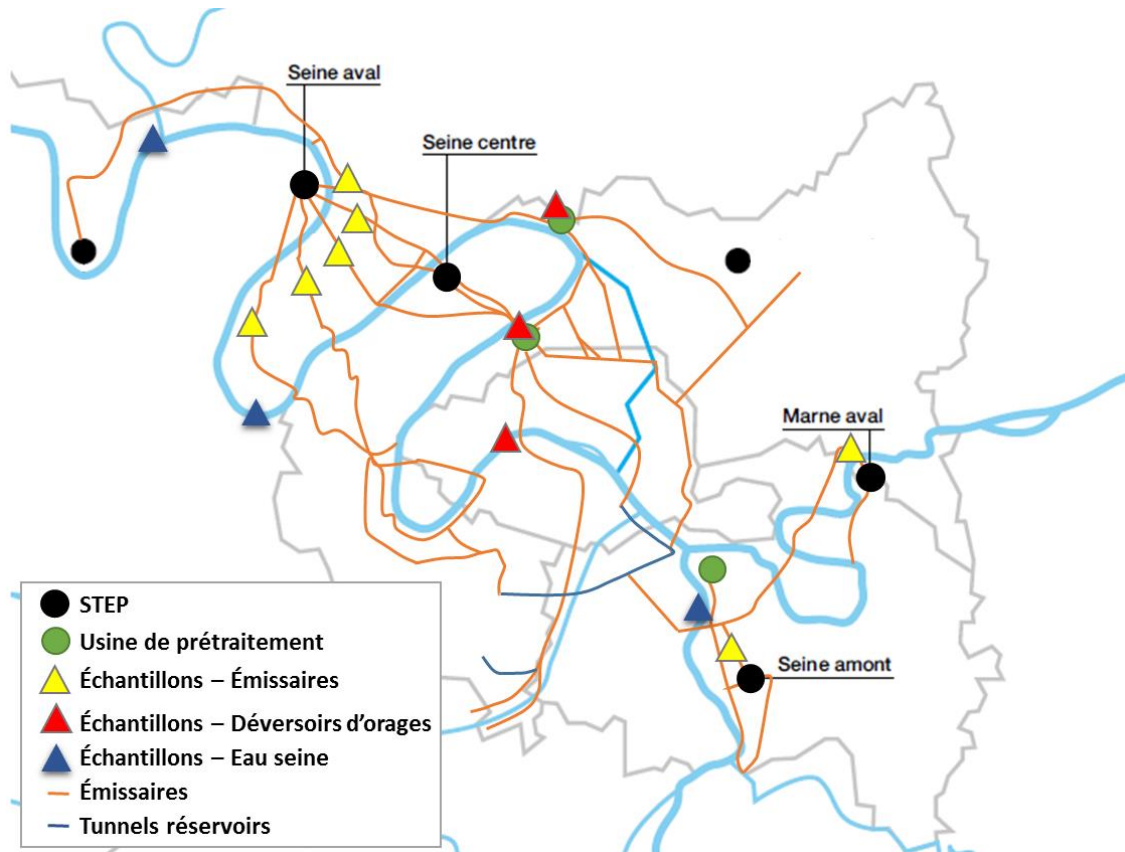


Figure 24 : Emplacement des différents échantillonnages

2.1.2 Protocole d'analyse des échantillons

Les échantillons d'eau sont homogénéisés et entre 250 mL et 800 mL (en fonction de la charge en particules) sont filtrés sous vide sur filtres en fibres de verre préalablement grillés à 500 °C et pesés. La filtration a lieu le jour du prélèvement pour limiter la dégradation de la matière organique et une évolution de la spéciation des molécules. Deux filtrations successives sont réalisées : la première sur des filtres de porosité 2,7 µm (GF/D, diamètre 90 mm, Whatman) et la seconde sur des filtres de porosité 0,7 µm (GF/F, diamètre 90 mm, Whatman). Environ 100 mL de filtrat sont conservés et acidifiés par ajout de 400 µL d'acide sulfurique (H₂SO₄, pureté 98 %, Merck) pour limiter la dégradation de la matière organique, et dopés avec 50 µL d'étalons d'extraction (PrPd4 et TCSd3) immédiatement après filtration. Les échantillons filtrés sont conservés à 4 °C dans des flacons en verre ambré et extraits moins de 24 h après filtration.

La fraction dissoute est extraite sur phase solide (SPE) avec des cartouches Oasis HLB® (6 mL, 200 mg, Waters). L'extraction est réalisée de façon manuelle à l'aide d'une enceinte d'extraction Visiprep™ (Sigma). Les étapes de l'extraction sont détaillées sur la Figure 25. Le jour de l'analyse 50 µL d'étalon d'injection (MePd4 et TCCd4) sont ajoutés aux échantillons, le mélange est évaporé sous azote à sec puis repris dans 1 mL de phase mobile (eau ultra-pure et méthanol 1 :1).

3 Screening ciblé des substituants aux parabènes par spectrométrie de masse haute résolution

L'objectif de cette partie est d'obtenir des données sur les concentrations en substituants aux parabènes dans les eaux usées et de surface, ces substances étant relativement peu mesurées dans les eaux.

3.1 Présentation des molécules

Sur les 56 autres conservateurs autorisés par le règlement *Cosmétiques*, l'industrie s'est principalement tournée vers un petit nombre d'entre eux (Ineris, 2015; Mintel database, 2015) dont les structures et principales propriétés physico-chimiques sont reportées dans le Tableau 4 et les concentrations actuellement autorisées dans les cosmétiques dans le Tableau 5.

L'**acide sorbique** est un acide gras insaturé également utilisé comme conservateur dans le secteur alimentaire. L'**acide benzoïque** a de nombreuses applications dans l'industrie des polymères et du papier. Il est présent dans des agents de revêtement, des produits nettoyants et en tant que conservateur dans les produits alimentaires. Dans les cosmétiques on trouve plutôt son sel de sodium, plus soluble, qui n'est pas irritant pour la peau, et moins pour la muqueuse oculaire (Wibbertmann, 2000). L'activité antimicrobienne des deux acides mentionnés ci-dessus est maximale à pH faible lorsque la forme non dissociée prédomine : la molécule non chargée, capable de traverser les membranes cellulaires, induit une acidification du cytosol inhibant certaines enzymes clés de la glycolyse (Plumridge et al., 2004; Warth, 1991).

L'**alcool benzylique**, alcool aromatique à chaîne latérale saturée, est un solvant utilisé dans les industries du bâtiment, de la chimie, du textile, du cuir, du papier, de la gomme et du plastique. C'est aussi un additif alimentaire, et en tant que conservateur il est utilisé dans les produits phytosanitaires et pharmaceutiques. Chez l'homme il est rapidement métabolisé en acide benzoïque (Scognamiglio et al., 2012).


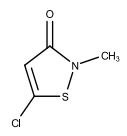
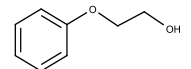
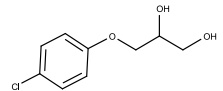
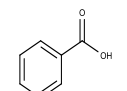
Le **2-phénoxyéthanol** (PE) est un éther de glycol possédant un noyau benzénique et une fonction alcool. Il est utilisé comme solvant pour peintures, vernis ou encres, mais aussi comme biocide entrant dans la composition de produits ménagers et industriels (Scognamiglio et al., 2012). En aquaculture on l'emploie pour son effet sédatif sur les poissons (Zahl et al., 2012). Il est fréquemment employé en association ou alternative aux PB et son utilisation augmente d'année en année (Kimura et al., 2014; Tamura et al., 2013). Son site d'action bactéricide est la membrane cellulaire, où il provoque une augmentation de la perméabilité aux ions potassium (Scognamiglio et al., 2012). Chez les nourrissons, il peut provoquer une dépression du système nerveux central à l'origine de diarrhées et de vomissement (FDA, 2013), et l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé conseille d'abaisser le seuil réglementaire de 1 % à 0,4 % dans les produits destinés aux jeunes enfants (ANSM, 2012).

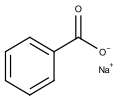
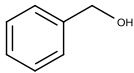
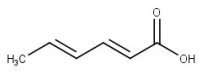
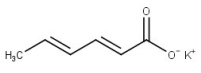
La **chlorphénésine** est également utilisée en substitution d'un autre conservateur micropolluant, le triclosan (Ineris, 2014). Généralement considérée comme non irritante, elle peut néanmoins accroître le potentiel irritant de crèmes contenant aussi des parabènes et du phénoxyéthanol (Johnson et al., 2014) et très occasionnellement entraîner une sensibilisation (Dyring-Andersen et al., 2015; Johnson et al., 2014). En particulier, elle montre une réaction

allergique croisée avec la méphénésine, un médicament aux propriétés myorelaxantes (Goossens et Lepoittevin, 2003).

La **méthylisothiazolinone (MIT)** et la **méthylchloroisothiazolinone (CMI)** font le plus parler d'elles du fait de leur toxicité cutanée. Elles possèdent un cycle insaturé comprenant un atome de soufre capable d'oxyder des résidus thiols et inhibent ainsi des enzymes nécessaires à la survie d'un grand nombre de bactéries, champignons ou algues (Alvarez-Rivera et al., 2012). Utilisées en tant que biocides, leurs applications industrielles sont nombreuses et elles sont intégrées dans de nombreux produits tels que désinfectants, peintures antifouling, produits de revêtement et de traitement du bois (Rafoth et al., 2007). Le nombre de cas de sensibilisations est en constante augmentation du fait du remplacement des PB par ces substances et en particulier par la MIT, moins dangereuse que la CMI mais beaucoup plus utilisée (Urwin et al., 2015). La CMI n'est autorisée que mélangée à la MIT, dans des proportions 3 :1.

Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques de quelques conservateurs de substitution des PB. M : masse molaire, T_E : température d'ébullition, P_t : point de fusion, K_{ow} : coefficient de partage octanol-eau, S : solubilité, P_{sat} : pression de vapeur saturante, K_H : constante de Henry

CAS	Structure	M (g/mol)	pKa	S (g/L)	T _f (°C)	T _E (°C)	Log K _{ow}	P _{sat} (Pa)	K _H (atm.m ³ /mol)
2682-20-4		115,2	-	24	44,2- 48,3	236	-0,49	0,4 - 0,99	5×10 ⁻⁸
C₄H₅NOS	Méthyl-isothiazolinone (MIT)								
26172-55-4		149,6	-	10	46,6- 54,9	167	0,40	0,9- 1,6	4,9×10 ⁻⁹
C₄H₄ClNOS	Méthylchloro- isothiazolinone (CMI)								
122-99-6		138,17	14,36	28,18	14	230	1,1	1-4	1,55×10 ⁻⁸
C₈H₁₀O₂	Phénoxyéthanol								
104-29-0		202,64	-	10,4	78		1,5		
C₉H₁₁ClO₃	Chlorophénésine								
685-85-0		122,12	4,2	2,90	122	249,2	1,88	0,11	4,54×10 ⁻⁸ - 1,97×10 ⁻⁷
C₇H₆O₂	Acide benzoïque								

CAS	Structure	M (g/mol)	pKa	S (g/L)	T _f (°C)	T _E (°C)	Log K _{ow}	P _{sat} (Pa)	K _H (atm.m ³ /mol)
532-32-1		144,11	4,2	556	330,6	464,9	-2,27	0,11	
C ₇ H ₅ NaO ₂	Benzoate de sodium								
100-51-6		108,13	15,4	40	-15,3	205	1,1	13	3,37×10 ⁻⁷
C ₇ H ₈ O	Alcool benzylique								
110-44-1		112,12	4,8	1,91	134,5	228	1,33	1	5,0×10 ⁻⁸
C ₆ H ₈ O ₂	Acide sorbique								
24634-61-5		150,22	4,8	58,5					
C ₆ H ₇ KO ₂	Sorbate de potassium								

MIT, CMI : inrs (fiche n° 290 : http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_290), Alvarez-Rivera et al. (2012) ; 2-Phénoxyéthanol : inrs (fiche n° 269 : http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_269), Scognamiglio et al. (2012)

Chlorphénésine : <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/104-29-0>

Acide benzoïque : ineris (<http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/491>)

Benzoate de sodium : ineris (<http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/1685>)

Alcool benzylique : inrs (fiche n° 170 : http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_170)

Acide sorbique : ChemIDplus (<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/110-44-1>, consulté en avril 2016)

Sorbate de potassium : HSDB (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~3io0Gt:3>, consulté en avril 2016)

Tableau 5 : Concentrations maximales autorisées de certains conservateurs de substitution des parabènes dans les produits cosmétiques (CE n° 1223/2009)

	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Type de produit
Acide benzoïque et son sel de sodium	2,5 % (en masse d'acide)	Produits à rincer hors bucco-dentaires
	1,7 % (en masse d'acide)	Produits bucco-dentaires
	0,5 % (en masse d'acide)	Produits sans rinçage
Acide sorbique et ses sels de calcium, potassium et sodium	0,6 % (en masse d'acide)	
Alcool benzylique	1 %	
Chlorphénésine	0,3 %	
Méthylisothiazolinone	0,01 %	
Méthylchloroisothiazolinone / méthylisothiazolinone (3/1)	0,0015 %	Produits à rincer
Phénoxyéthanol	1 %	

3.2 Recherche bibliographique sur l'analyse des substituants

Les molécules choisies ont été très peu analysées dans les eaux urbaines et les milieux aquatiques récepteurs. Seulement une dizaine d'études ont été recensées et sont référencées dans le Tableau 6. Les **isothiazolinones** ont été analysées par LC-MSMS dans les produits cosmétiques, dans les eaux usées et les eaux de surface (Bollmann et al., 2014; Speksnijder et al., 2010; Wittenberg et al., 2015). Le **phénoxyéthanol** (Kim et al., 2015) et le **sodium benzoate** (Gören et al., 2015) ont été analysés par LC-MSMS dans des aliments. L'**alcool benzylique** a été analysé en LC-UV (Baranowska and Wojciechowska, 2013; Wu et al., 2014). Enfin, la **chlorphénésine** a été analysée soit en LC-UV (Zhu et al., 2014) soit en GC-MS (Kimura et al., 2014).

L'extraction de ces substances se fait principalement par extraction sur phase Oasis HLB qui semble convenir à l'ensemble des substances. Pour éviter les formes ioniques, une acidification semble nécessaire.

3.3 Développement de la méthode

Le développement de la méthode est réalisé en collaboration avec le Pr. Gomez de l'Université de Montpellier au laboratoire Hydrosciences. Des premiers essais ont été conduits sur un Orbitrap LC-MS Exactive™ (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) équipé d'une source d'ionisation par electrospray chauffée ou heated electrospray ionization probe (HESI), opérant alternativement en mode full MS et en mode MS/MS et avec une calibration de masse externe. Il permet l'identification des masses de m/z comprises entre 50 et 6000 à haute résolution de masse (high resolution accurate mass, HRAM).

En parallèle, une méthode est développée en SPE-online sur l'appareil LC-MSMS du Leesu pour déterminer si une adaptation de la méthode actuelle de dosage des parabènes, triclosan et triclocarban est envisageable. L'intérêt de la SPE Online est un important gain de temps et de sensibilité.

Tableau 6 : Bibliographie sur les méthodes analytiques permettant de quantifier les substituants dans les eaux ou les produits cosmétiques

Molécules	Matrices	Méthode analytique	Méthode d'extraction	Référence
Phénoxyéthanol Acide benzoïque	Cosmétiques	- HPLC/PDA detector - L-column ODS - acétonitrile / eau +5mmol/M ammonium formate (acide formique pH4,2)	Dilution 0,2g dans 10mL méthanol+filtration	(Aoyama et al., 2014)
MIT CMI Alcool benzylique Potassium sorbate Sodium benzoate	Cosmétiques Eaux rivières	- HPLC/DAD detector - Develosil aqueous AR5 RP30 (250x4,6mm, 5µm) - acétonitrile / eau + 0.1 acide formique - 0min : 15%ACN, 5min 15 %ACN, 7min 25 %ACN, 17min 25 %, 19min 15 %, 22min 15 %	- Eau acidifiée pH2 : SPE, Oasis HLB 6mL (5mL MeOH, 3mL eau acidifiée, percolation, séchage, et élution par phase mobile (ACN15% eau 85% acide formique) - cosmétique : dilution dans l'eau ou extraction méthanol et ultrasons	(Baranowska and Wojciechowska, 2013)
MIT	Eaux de STEU	- HPLC-MS/MS using ESI+ - Synergy Polar-RP column (L¼150 mm, ID¼2 mm, particles¼4mm, Phenomenex - A neutral multi-STEU gradient of water 0,2 % acide formique (A) et méthanol (B)	SPE-cartridge (Bakerbond SDB-2, 6 mL)	(Bollmann et al., 2014)
MIT CMI	Eaux environnementales	GC/MS		(Rafoth et al., 2007)
Phénoxyéthanol / PEd4 Chlorphénésine	Eau rivière	GC/MS	SPE Oasis HLB plus InertSepSlimJ	(Kimura et al., 2014)
MIT CMI	Eau potable Eaux de surfaces Effluents de STEU Cosmétiques	- LC/MSMS - Aqua C18 125 A 250mm x 4.6mm - Méthanol / eau + 0,1 % acide formique - ESI+ - Gradient 90 % eau à 54 % pendant 19min, 54 à 10 % pendant 1 min, 15 min à 10 %, retour à 90% en 10min	Pas d'extraction, injection directe de 10mL.	(Speksnijder et al., 2010)

MIT CMI CMI-d3	Cosmétiques	<ul style="list-style-type: none"> - UPLC/MSMS - 1,7 µm HSS T3 UPLC (50 mm×2,1 mm id) - MeOH / eau + 0,1 % acide formique - 7 % MeOH jusqu'à 0,75 min, rampe à 90 % jusque 4 min, plateau à 90 % jusque 4,5 min, retour à 7 % pendant 0.5 min 	100 mg de produit dans 15 mL MeOH/eau 80/20 (v/v).	(Wittenberg et al., 2015)
MIT CMI		<ul style="list-style-type: none"> - UPLC/MSMS - Hypersil Gold aQ, 100mm×2.1mm x3µm - water/formic acid (0,1 %)/ammonium acetate (5 mM) ET methanol/formic acid (0,1 %)/ammonium acetate (5 mM) - Gradient (70 % (eau) 30 % (MeOH) à 0 % 100 % en 13 min puis plateau à 19 min - ESI + 		(Alvarez-Rivera et al., 2012)
Phéoxyethanol	Tissus animaux	<p>LC/MSMS</p> <ul style="list-style-type: none"> - C18 (150mm x 2,1mm x 2,1µm) - Acétonitrile / eau +acide formique 0,1 % (isocratique) - 0,3 mL/min - 		(Kim et al., 2015)
MIT CMI Phéoxyethanol Alcool benzylique		<p>UPLC/UV (16min ou moins car ils sortent au début)</p> <ul style="list-style-type: none"> - BEH C18 column (50mmx2,1mmx1,7µm) - Eau / méthanol +0,1 % acide formique - 0min : 90 % eau, 5 min 50 %, 6min 50 %, 8.5 min 25%, 10 min 0 %, 12 min 0 %, 14 min 90 % et 16 min 0 % 		(Wu et al., 2014)
Sodium benzoate	Aliments	<ul style="list-style-type: none"> - LC/MSMS - phenomenex 150x2 mm, 4µm - tampon acétate d'ammonium / méthanol (50:50, v/v). 		(Gören et al., 2015)
Chlorphénésine	Cosmétiques	<ul style="list-style-type: none"> - HPLC - méthanol-eau 		(Zhu et al., 2014)

4 Évaluation de l'impact écotoxicologique de la substitution des parabènes

Aussi essentielle que soit l'analyse physicochimique, elle ne permet pas de prédire les réponses des systèmes biologiques exposés à des mélanges complexes. Cela est rendu possible par bioessais.

4.1 Approche théorique

La toxicité, l'écotoxicité et l'occurrence des substances décrites au paragraphe 3.1. ont été étudiées afin d'évaluer de façon théorique quel pourrait être l'impact des changements de formulation des produits cosmétiques sur les rejets vers les milieux aquatiques. Les résultats de cette recherche bibliographique seront présentés dans le livrable 4 du projet Cosmet'eau. En résumé cette recherche bibliographique a montré que les substituants ont, comme les parabènes, des effets toxiques sur les êtres vivants et que les données sont encore trop rares pour décrire l'exposition aux substituants. Une attention toute particulière devrait être portée à la CMI et au MIT à cause de leur toxicité, au phénoxyéthanol qui pourrait par son caractère amphiphile favoriser la bioabsorption d'autres molécules et ainsi en potentialiser les effets toxiques, ainsi qu'à la chlorphénésine trop peu documentée.

4.2 Approche globale par bioessais : qualité d'eaux grises synthétiques représentant différentes pratiques de consommation

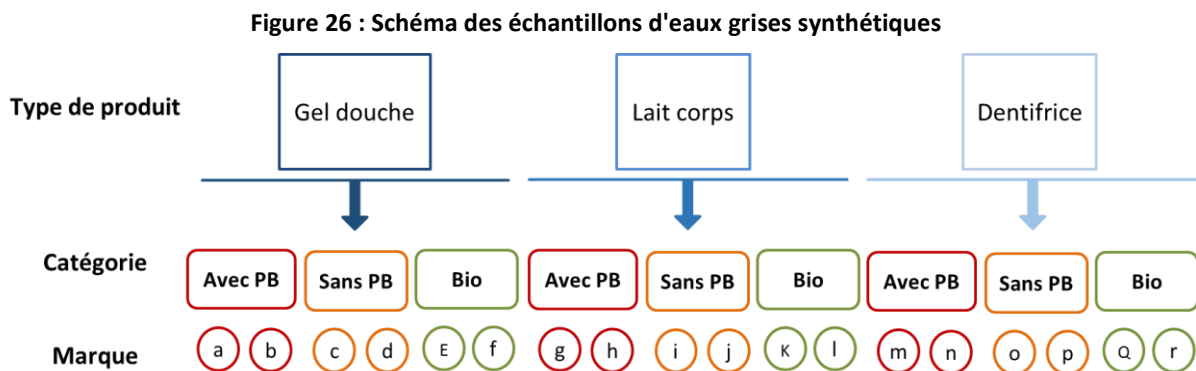
Des échantillons d'eaux grises synthétiques représentatifs de différents modes de consommation (produit classique avec parabènes, produits sans parabène et produits biologiques) ont été réalisés et leur toxicité a été évaluée par Tronico VigiCell. Ces eaux grises « simplifiées » ont été réalisées par dilution de produits contenant ou non des parabènes ou encore biologiques, en s'appuyant sur des données de consommation (Ficheux et al., 2015, 2016).

4.2.1 Préparation des eaux grises synthétiques représentant différentes pratiques de consommation

4.2.1.1 Sélection des produits

Trois catégories de produits reflétant différentes pratiques de consommation autour de la problématique de la substitution des PB ont été considérées : avec PB, sans PB, et biologique. Pour le choix des produits sans PB, ceux portant explicitement une mention « sans parabène » ont été privilégiés. Les produits bio sélectionnés sont labélisés *Ecocert* ou *Cosmebio*. Ces deux labels n'autorisent que les conservateurs suivants : acide benzoïque et son sel de sodium, acide déshydroacétique, alcool benzylique, acide sorbique et son sel de potassium. Les produits n'ont pas été analysés pour vérifier l'adéquation entre les mentions indiquées et leur composition réelle. Une surveillance du marché conduite par l'Agence française de sécurité

sanitaire des produits de santé en 2009 (Afssaps, 2009) a montré que les non-conformités des produits biologiques ou sans PB vis-à-vis des conservateurs étaient exceptionnelles. Ces trois catégories ont été déclinées au sein de trois types de produits quantitativement très utilisés et de texture différente : gel douche, lait corporel et dentifrice. À la différence des gels douche ou dentifrices, l'utilisation des laits corporels n'implique pas leur déversement immédiat dans le réseau d'eau usée. Néanmoins, il est possible qu'une partie puisse rejoindre le réseau à distance de l'utilisation lors de la douche ou du lavage de vêtements imprégnés. De plus, le marché des produits cosmétiques voit actuellement l'apparition de laits destinés à être appliqués sous la douche. Deux marques de produits de chaque catégorie ont chaque fois été considérées. Les échantillons sont récapitulés Figure 26.



4.2.1.2 Protocole de préparation des échantillons d'eaux grises synthétiques

Afin de refléter la pratique réelle, les échantillons ont été réalisés sur la base de données de consommation (Ficheux et al., 2016, 2015). Deux possibilités ont été envisagées pour le choix des concentrations : la première consistait à considérer les quantités de produit et d'eau utilisées lors d'une utilisation, et la seconde à replacer la consommation à l'échelle de la journée en utilisant les quantités journalières consommées. L'une est très proche de la pratique, tandis que l'autre considère la consommation moyenne sur une journée et intègre l'étape de dilution au sein de l'ensemble des eaux grises, ce qui est plus près du contenu du réseau d'assainissement. Cette deuxième approche permet de considérer un volume d'eau (usée ou grise) moyen unique pour l'ensemble des produits alors que la première nécessite d'évaluer des volumes particuliers (douche, brossage des dents), plus sujets à variabilité. C'est donc la seconde option qui a été retenue.

Une étude a récemment été menée au sein de la population française pour obtenir des données concernant les fréquences d'utilisation des produits cosmétiques d'une part (Ficheux et al., 2015), et les masses consommées lors de chaque utilisation d'autre part (Ficheux et al., 2016). L'objectif de ces travaux est de produire des données de consommation exploitables pour évaluer l'exposition aux substances présentes dans les cosmétiques dans le cadre d'évaluation de risques sanitaires. Ces données de masses moyennes journalières consommées, et des données de consommation d'eau (96 L, Tableau 7) ont été retenus pour le calcul des concentrations (Tableau 8).

En pratique, de l'eau du robinet a été ajoutée par pesée à des aliquots de produits pour atteindre les concentrations visées. Les échantillons ont été homogénéisés et 200 mL ont été

conservés dans des flacons en verre et acheminés en glacière réfrigérée à l'entreprise Tronico VigiCell qui filtre les échantillons sur filtres de porosité 0,22 µm avant la réalisation des bioessais. Un échantillon d'eau du robinet a également été envoyé comme témoin.

Pour tester la répétabilité du protocole, le pH, la conductivité et le carbone organique dissous (COD) ont été mesurés sur des triplicats des trois types d'échantillons à des concentrations de type eaux usées. Pour préparer la mesure du COD, 2 mL d'acide orthophosphorique (H₃PO₄, à 85 %) ont été ajoutés à 38 mL d'échantillon dans des tubes en verre de 40 mL fermés avec des bouchons possédant un septum en téflon. Les tubes ont été conservés à 4 °C jusqu'à l'analyse par un analyseur de carbone Shimadzu. Avec des coefficients de variation ne dépassant pas 7,5 %, les trois paramètres ont montré une faible variabilité (Tableau 9) indiquant que le protocole est correctement répétable.

Tableau 7 : Volume d'eau consommé par habitant, par type d'utilisation (en L/j/habitant), issu de Deshayes et al., 2015

Utilisation	CIEAU ^a (2012)	Eau de Paris ^b (2013)	SEDIF ^c (2013)	Deshayes et al. (2015)
Douches/bain	49	46,8	57-78	46,8
Toilette	25	24	30-40	24
Lave-linge	25	14,4	18-24	14,4
Vaisselle et lave-vaisselle	12	–	15-20	12
Jardin	8	–	9-12	ND
Préparation repas	9	12	9-12	ND
Eau de boissons	1	1,2	1,5-2	ND
Autres utilisations	8	21,6	9-12	ND
Sols	–	–	–	0,53
Lavabo	–	–	–	7,2
Total	137	120	150-200	120

a : www.cieau.com ; b : www.eaudeparis.fr ; c : www.sedif.com ; ND : non déterminé.

Tableau 8 : Données de consommation de produits dans la population française d'après Ficheux et al. (2015, 2016) et concentration des échantillons d'eaux grises (% correspond au pourcentage d'utilisateurs dans la population considérée)

	Femmes			Hommes			Masse journalière ¹ (mg/j)	Concentration échantillons (mg/L)
	%	Fréquence (j ⁻¹)	Masse / Utilisation (mg)	%	Fréquence (j ⁻¹)	Masse / Utilisation (mg)		
Gel douche	91	1,04	10 200	82	0,97	11 200	10 729	111,7
Lait corps	61	0,73	9 000	17	0,63	8 400	6 291	65,5
Dentifrice	54	1,59	1 275,9	57	1,52	1 521,7	2 174,7	22,7

¹ Moyenne pondérée par les pourcentages relatifs d'utilisateurs parmi les hommes et les femmes.

Tableau 9 : Paramètres mesurés sur les échantillons pour tester la répétabilité du protocole. Moyenne \pm écart-type (coefficient de variation en %). n = 3 pour chaque type d'échantillon

	pH	Conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Carbone organique dissous (mg/L)
Gel douche	7,4 \pm 0	589,33 \pm 2,52 (0,42)	5,34 \pm 0,40 (7,50)
Lait corps	7,4 \pm 0	582,33 \pm 0,58 (0,10)	4,71 \pm 0,15 (3,18)
Dentifrice	7,4 \pm 0	583,33 \pm 2,08 (0,36)	3,31 \pm 0,08 (2,42)

4.2.2 Bioessais

L'utilisation d'un panel de bioessais permet d'évaluer l'effet des eaux produites sur différents organismes et sur plusieurs types d'effets (Di Paolo et al., 2016).

Les bioessais cellulaires sont réalisés par Tronico VigiCell. Ils sont organisés en panel d'impact et conçus pour rendre compte des différentes toxicités associées aux micropolluants en phase aqueuse. Au sein de chacun des panels, les bioessais, combinés en couple selon le concept de différentiel cellulaire, permettent d'évaluer de façon graduée les effets des substances, de leurs produits de dégradation et de leurs mélanges, sur les principaux groupes du vivant.

Le panel de toxicité générale est constitué de : (1) mesure de l'effet sur la croissance des bactéries (deux souches de *Escherichia coli* de sensibilité différente), des algues unicellulaires (deux souches de *Chlamydomonas reinhardtii* de sensibilité différente), et des levures (deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* de sensibilité différente). Mais aussi l'effet sur les capacités germinatoires d'un champignon (*Septoria tritici*), et l'effet sur la viabilité de cellules humaines primaires sanguines mononuclées (PBMC).

Le panel de perturbation endocrinienne a pour tests : (2) les perturbations endocriniennes de type œstrogénique agoniste et antagoniste sur lignée cellulaire modifiée d'adénocarcinome mammaire d'origine humaine (MELN), de type androgénique agoniste et antagoniste sur lignée cellulaire prostatique humaine modifiée (PALM) et de type thyroïdienne agoniste et antagoniste sur une lignée cellulaire de cancer du col utérin modifiée (HG5LN).

Le panel de génotoxicité comprend : (3) les atteintes sur l'ADN circulaire procaryote des bactéries *E. coli* et atteintes sur l'ADN chromosomique eucaryote des cellules humaines (carcinome du rein et du colon) équipées ou pas de systèmes de métabolisation.

Ces tests sont récapitulés dans le Tableau 10. La significativité des tests, fournie par Tronico VigiCell, est fonction du seuil d'effets fixé pour chacun des tests lors de leur développement et validation.

Tableau 10 : Bioessais réalisés par Tronico VigiCell

	Organisme	Témoin positif	Durée	Effet mesuré	Mesure
Toxicité générale	Bactérie E. coli	ampicilline	7 h	Croissance	Absorbance à 600 nm
	Bactérie E. coli sensible	ampicilline	7 h	Croissance	Absorbance à 600 nm
	Champignon S. tritici	cadmium	7 j	Croissance	Absorbance à 600 nm
	Algue C. reinhardtii	diuron	48 h	Croissance	Absorbance à 600 nm
	Algue C. reinhardtii sensible	diuron	48 h	Croissance	Absorbance à 600 nm
	Levure S.cerevisiae	cadmium	24 h	Croissance	Absorbance à 600 nm
	Levure S.cerevisiae sensible	cadmium	24 h	Croissance	Absorbance à 600 nm
	Cellules humaines	cadmium	24 h	Viabilité	Luminescence
Perturbation endocrinienne	Cellules MELN	17 β -œstradiol	18 h	Activation du récepteur humain α aux œstrogènes	Luminescence
	Cellules PALM	méthyltriénolone	18 h	Activation du récepteur humain aux androgènes	Luminescence
	Cellules HG5LN		18 h	Activation du récepteur humain aux stéroïdes thyroïdiens	Luminescence
Géno-toxicité	Bactérie E. coli	acide nalidixique	3 h	Expression du gène <i>recA</i>	Luminescence
	Cellules LS174T	Benzo[a]pyrène	72 h	Phosphorylation de l'histone H2ax	Fluorescence
	Cellules AChn	etoposide	72 h	Phosphorylation de l'histone H2ax	Fluorescence

4.2.2.1 Toxicité générale

Les bactéries *E. coli* sont maintenues en culture à 4 °C sur boîtes de Petri en milieu LB agar solide et repiquées sur boîtes identiques régulièrement selon les besoins. La veille de l'expérimentation, un prélèvement est effectué et les deux souches de bactéries à sensibilités différentielles soumises de concert à une étape de culture sur la nuit en milieu LB liquide avec agitation douce à 37 °C. Le lendemain, les bactéries sont reprises à une densité optique à 600nm (DO₆₀₀ – lecteur Victor 3 Perkin Elmer) de 0,2 dans un mélange contenant 90 % de l'eau à tester et 10 % (v/v) d'un milieu de culture bactérienne concentré produit au laboratoire. Les bactéries sont incubées à 37 °C sous agitation douce et la DO₆₀₀ correspondant à leur multiplication mesurée en continu toutes les 40 min pendant 7 h. Parallèlement, la même expérience est réalisée pour chaque souche sur un témoin négatif constitué d'eau apyrogène stérile pour usage médical et un témoin de toxicité ampicilline. Les aires sous la courbe des échantillons sont comparées à celles des témoins.

Les algues *C. reinhardtii* sont maintenues en culture à 25 °C sur boîtes de Petri en milieu TAP agar solide sous éclairage blanc de 6500 °K et régulièrement repiquées. La veille de l'expérimentation un prélèvement est effectué et les algues (souche native et souche sensible) sont soumises à une étape de culture la nuit en milieu minimum liquide avec agitation douce à 25 °C, toujours sous éclairage de 6500 °K. 0,2 mL de cette culture sont repris et additionnés à 2 % à un mélange contenant l'eau à tester à 80 % et 20 % d'un milieu concentré produit au laboratoire. Les algues sont incubées à 25 °C sous agitation douce (100 rpm) et éclairage et la DO₇₅₀ (Lecteur Victor 3 Perkin Elmer) mesurée après 48 h. Parallèlement, la même expérience est réalisée pour chaque souche sur un témoin négatif constitué d'eau apyrogène stérile et un témoin de toxicité diuron.

Les champignons *S. tritici* est maintenu en culture à température ambiante sur boîtes de Petri en milieu PDA agar solide et repiqués sur boîtes identiques régulièrement. Le jour de l'expérimentation, un prélèvement par grattage est effectué et les spores de la gelée sporogène sont remises en suspension dans un mélange nutritif propriétaire contenant 90 % de l'eau à tester à température ambiante. La DO₆₀₀, proportionnelle au nombre de cellules en solution, est mesurée (Lecteur Victor 3 Perkin Elmer) à heure fixe tous les jours pendant 7 jours. Parallèlement, la même expérience est réalisée sur un témoin négatif constitué d'eau apyrogène stérile et un témoin de toxicité cadmium. Les aires sous la courbe des échantillons sont comparées à celles des témoins.

Les levures *S. cerevisiae* sont maintenues en culture à 4 °C sur boîtes de Petri en milieu Sabouraud agar solide et repiquées sur boîtes identiques régulièrement selon les besoins. La veille de l'expérimentation, un prélèvement est effectué et les deux souches de levure à sensibilités différentielles sont soumises à une étape de culture - sur la nuit pour les levures non sensibles et sur la nuit + 24 h pour les levures sensibles - en milieu YPD liquide avec agitation à 25 °C en atmosphère à humidité saturée. Le jour de l'expérience, les levures non sensibles sont reprises à une concentration de 100 000 cellules/mL dans un mélange contenant 90 % de l'eau à tester et 10 % d'un milieu de culture levure concentré propriétaire (v/v), les levures sensibles étant quant-à-elles reprises à 500 000 cellules/mL dans un milieu propriétaire contenant 90 % de l'eau à tester. Les levures sont incubées à 37 °C sous agitation douce en atmosphère saturée en humidité et la DO₆₀₀ correspondant à leur multiplication mesurée en continu (Lecteur Victor 3 Perkin Elmer) toutes les heures pendant 7 h. Parallèlement, la même expérience est réalisée pour chaque souche sur un témoin négatif constitué d'eau apyrogène stérile et un témoin de toxicité cadmium. Les profils des courbes

de réponse sont intégrés sur tous les points expérimentaux, et les courbes échantillons sont comparées aux témoins et/ou entre elles.

Les cellules mononuclées de sang périphérique humain sont conservées en aliquots à -150 °C. Le jour de l'expérience, les cellules sont décongelées en quelques minutes au bain-marie à 37 °C puis lavées par ajout de milieu RPMI1640 et centrifugation à 1 100 tours/minute. Elles sont reprises à une concentration de 30 000 cellules par puits en plaques 96 puits dans un milieu contenant 10 % de milieu RPMI1640 10x et 90 % d'eau à tester (v/v). Parallèlement, la même expérience est réalisée sur un témoin négatif constitué d'eau apyrogène stérile et un témoin de toxicité cadmium. Après 24 h d'incubation, la viabilité cellulaire est mesurée par détection lumineuse (lecteur Victor 3 Perkin Elmer) à l'aide du kit ATP Lite One STEU Perkin Elmer. La luminescence est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

4.2.2.2 Perturbation endocrinienne

Les **cellules MELN** (détection des agonistes et antagonistes oestrogènes), **HG5In** (détection des agonistes et antagonistes thyroïdiens) et **PALM** (détection des agonistes et antagonistes androgènes) sont utilisées au travers d'une licence d'exploitation INSERM en collaboration avec le laboratoire du Dr. Ballaguer de Montpellier¹. Elles sont maintenues en culture par repiquages hebdomadaires en milieu DMEM/F12 complet contenant des antibiotiques de sélection adaptés (G418 pour MELN et G418+puromycine pour PALM). 2 jours (pour les PALM et HG5LN) ou 3 jours (pour les MELN) avant la mise en contact avec les eaux à tester, elles sont « trypsinées », c'est à dire exposées à un enzyme favorisant le détachement des cellules du support de culture en vue de conduire à une solution de cellules en suspension, et ensemencées à raison de 50000 cellules par puits dans des plaques 96 puits spéciales luminescence, en milieu DMEM/F-12 complet sans rouge de phénol. Le jour de l'expérimentation, les cellules sont mises en contact avec les eaux à tester au travers de l'ajout successif de milieu sans rouge de phénol 1x puis d'un mélange de milieu concentré contenant l'eau à tester pour une proportion finale d'échantillon de 64 %. Parallèlement, la même expérience est réalisée pour chaque type cellulaire sur un témoin négatif constitué d'eau apyrogène stérile et un témoin positif contenant l'agoniste d'intérêt (17 β -oestradiol ou méthyltriénolone) à 10⁻⁸ M. Pour mesurer les effets antagonistes, les eaux à tester sont rajoutées selon la procédure précédemment décrite, mais elles-aussi enrichies avec les agonistes à 10⁻⁸M. Après 18h d'incubation, la luminescence est mesurée (Lecteur Victor 3 Perkin Elmer). Son augmentation est proportionnelle à la présence d'agonistes hormonaux dans les eaux à tester, et sa diminution est proportionnelle à la présence d'antagonistes.

4.2.2.3 Génotoxicité

Sur bactéries. Des biosondes bactériennes développées par le Pr. Belkin de l'Université Hébraïque de Jerusalem sont utilisées². Ces bactéries E. coli génétiquement modifiées, bioluminescentes en cas d'activation de la signalisation de réponse aux dommages à l'ADN, sont maintenues en culture à 4 °C sur boîtes de Petri en milieu LB agar solide. La veille de

¹ Grimaldi, M. et al. Reporter Cell Lines for the Characterization of the Interactions between Human Nuclear Receptors and Endocrine Disruptors. *Front. Endocrinol.*, 6: 62, 2015.

² Rosen, R. et al. Microbial sensors of ultraviolet radiation based on recA':lux fusions. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 89 (2-3) : 151-160, 2000.

l'expérimentation, un prélèvement par grattage est effectué puis les bactéries sont soumises à une étape de culture sur la nuit en milieu LB ampicilline liquide avec agitation douce à 37 °C. Le lendemain, une culture en milieu LB ampicilline liquide estensemencée au 100^{ième} à partir de la pré-culture et incubée pendant 1h30 à 37 °C en atmosphère humide jusqu'à obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,2 unité (DO₆₀₀ – lecteur Victor 3 Perkin Elmer) de 0,2 et soumise à une nouvelle incubation pendant 1h30 à 37 °C en atmosphère humide. Après centrifugation, elles sont ensuite reprises dans un milieu LB ampicilline agar solide pour ensemencement sur une plaque 96 puits (100 µL de solution bactérienne). Les eaux à tester sont ajoutées telles quelles sur les puits à raison de 100 µL et la bioluminescence est mesurée (lecteur Victor 3 Perkin Elmer thermostaté à 37 °C) toutes les 5 minutes pendant 3 h. Un contrôle positif acide nalidixique est ajouté en parallèle. L'apparition d'une bioluminescence témoigne de l'activation d'une réponse en cas d'atteintes au matériel génétique des bactéries sondes. Les aires sous la courbe des échantillons sont comparées à celles des témoins.

Sur cellules humaines : La génotoxicité est mesurée par le test de modification H2AX utilisé en collaboration avec le Dr. Marc Audebert du laboratoire Toxalim (UMR 1331, INRA/ École nationale vétérinaire de Toulouse /Institut National Polytechnique de Toulouse - École d'Ingénieurs de Purpan/Université Paul Sabatier). La présence de génotoxicité est révélée par l'augmentation du rapport H2AX modifié par rapport à la quantité d'ADN totale, laquelle permet aussi de qualifier (et de normaliser en regard) une éventuelle toxicité d'ordre général et non spécifiquement génotoxique. Deux types cellulaires humains sont utilisés - une souche de cellules rénales présentant des caractéristiques de métabolisation très faibles et une souche de cellules d'épithélium intestinal avec une expression correcte des cytochromes permettant la métabolisation. Elles sont maintenues en culture par repiquages hebdomadaires sur flasques de culture 75 cm² en milieu MEM Eagle complet et ensemencées en plaques 96 puits pour expérimentation, un jour avant cette dernière, à raison de 40000 cellules par puits pour les cellules non métabolisantes et 300000 cellules par puits pour les cellules métabolisantes. Le jour de l'expérience, les cellules sont mises en contact avec un milieu adapté contenant 50 % au final d'eau à tester en volume. Parallèlement, la même expérience est réalisée pour chaque type cellulaire sur un témoin négatif constitué d'eau apyrogène stérile et un témoin positif étoposide sur cellules non métabolisantes (cette molécule ne nécessitant pas de métabolisation pour être génotoxique) ou benzo[a]pyrène sur cellules métabolisantes (le benzo[a]pyrène étant activé par la métabolisation). Après 24h d'exposition dans ces conditions, les cellules sont soumises à un protocole de marquage In-Cell Western™ pour mettre en évidence les modifications d'H2AX (protéine carrefour de la réponse de signalisation/réparation génotoxique) via lecture sur un imageur Odyssey CLx (Li-Core).

4.3 Approche par substances : effets des parabènes et de leurs substituants, seuls ou en mélange, sur zebra fish

L'approche globale par bioessais a montré ses limites méthodologiques et ne permet pas de relier les effets aux conservateurs, que ce soit des parabènes ou leurs substituants. Une approche par substance sur un modèle biologique représentatif des milieux aquatiques, le poisson zèbre, a donc été mise en place en collaboration avec le Pr. Laure Garrigue-Antar et le Dr. Christophe Morin du Laboratoire Croissance, Réparation et Régénération Tissulaires (CRRET) de l'Université Paris-Est Créteil.

4.3.1 Présentation du poisson zèbre

Le poisson zèbre (*Danio rerio* ou zebra fish en anglais, voir Figure 27) est un petit poisson tropical robuste d'environ 3 cm qui est utilisé pour évaluer l'écotoxicité des substances chimiques (Hill 2005). Ce modèle a l'avantage d'être de petite taille, de se reproduire rapidement dans un espace réduit. Sa relative transparence permet l'observation directe de son développement de façon non destructive. Cette espèce mute facilement, produisant des lignées albinos plus fragiles.

Il existe une méthode normée qui permet de déterminer la toxicité aiguë ou létale des produits chimiques chez le poisson-zèbre au stade embryonnaire à 96 h (OCDE, n.d.). La méthode développée par le CRRET permet d'observer les effets à plus long terme jusqu'à 6 jours.



Figure 27 : Poisson zèbre (normal à gauche et albinos à droite)

L'espèce utilisée a été modifiée génétiquement (souche HB9) pour rendre certaines cellules nerveuses, les motoneurones, fluorescentes, permettant une observation directe du développement de ces structures. La Figure 28 montre des photos de larves bien développées. On observe la tête [1], les yeux [2], la queue [3] et la formation des nageoires latérale [4]. Le sac vitellin [5] se situe entre la tête et la queue et contient des éléments nutritifs nécessaires au développement. Cette partie du corps contient également la vessie natatoire de forme sphérique qui permet à la larve de flotter ou de se tenir droite dans l'eau et assure ainsi un bon développement.

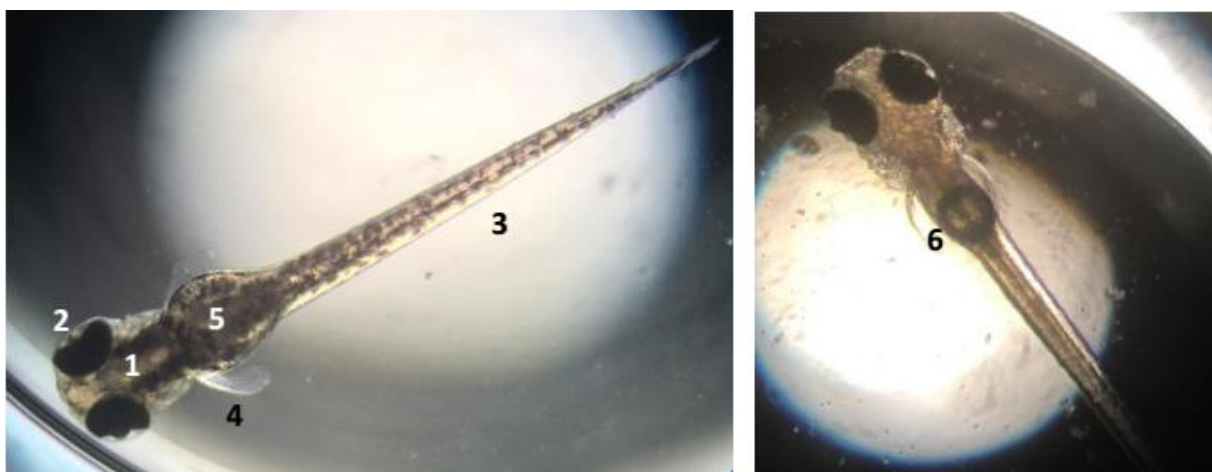


Figure 28 : Larves de poisson zèbre développées normalement (1 : tête ; 2 : yeux ; 3 : queue ; 4 : formation des nageoires latérale ; 5 : sac Vitellin ; 6 : vessie natatoire) La vie du poisson zèbre commence par l'état embryonnaire entre 0 et 72 h, puis l'état larvaire après éclosion de l'œuf entre 72 h et 29 jours. Il passera ensuite par l'état juvénile avant d'atteindre l'âge adulte.

4.3.2 Protocole expérimental

Les œufs sont exposés 24 h après la fécondation aux solutions à tester pendant une période maximale de 8 jours. Au-delà les larves devenant capables de se nourrir de façon autonome, l'étude relèverait de l'expérimentation animale.

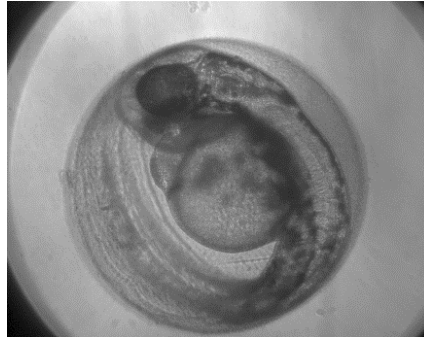


Figure 29 : Œuf (48 h après ponte)

4.3.2.1 Production des œufs et exposition aux solutions à tester

La veille au soir du jour où on souhaite obtenir des œufs, des poissons reproducteurs mâles et femelles (dans un rapport d'environ 2 :1) sont placés dans des cuves de frai maintenues à 28,5 °C. Ces cuves sont munies en leur fond d'une grille qui permet le passage des œufs mais les protège de la prédation des adultes. Le lendemain, la ponte et la fertilisation des œufs ont lieu dans un délai d'environ 30 min après illumination des cuves.

Les œufs (50 à 200 par ponte) sont rapidement récupérés, rincés avec du milieu E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mgSO₄) et maintenus dans ce milieu à 28,5 °C. Après 24 h, les œufs fécondés sont prélevés à l'aide d'une pipette et déposés dans les puits d'une plaque 96 puits (voir Figure 30), un œuf par puits. À cette étape, les œufs non fécondés se distinguent des œufs fécondés, transparents, par leur aspect opaque blanc laiteux. Les œufs contaminés par des champignons filamenteux sont également écartés. Cet intervalle de 24 h entre la ponte et le début de l'expérience permet d'éliminer les œufs naturellement non viables.

Le milieu transféré avec l'œuf est éliminé par aspiration à l'aide d'une pipette à cône fin et rapidement remplacé par 200 µL de la solution à tester (substances diluées dans le milieu E3 à la concentration souhaitée). Dans chaque lignée (œufs issus des mêmes parents), 10 œufs sont testés dans chaque condition et l'expérience est ensuite répétée sur 2 lignées différentes. Les plaques sont conservées à 28,5°C dans un incubateur (voir Figure 30), observées chaque jour à la loupe binoculaire et éventuellement au microscope inversé (Axiovert 40C, Zeiss) pour la prise de photos.

Les premiers essais de répétabilité n'étant pas concluants, nous avons suspecté l'évaporation du milieu de culture dans les puits périphériques de la plaque. Dans les expériences suivantes, ces puits n'ont plus été utilisés et ont été remplis d'eau afin de limiter l'évaporation dans les autres puits. Le protocole optimisé présente désormais une répétabilité acceptable (coefficients de variation inférieurs à 20 %).

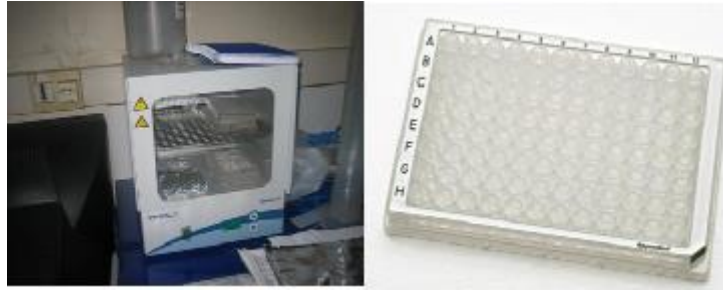


Figure 30 : Incubateur (à gauche) et plaque 96 puits (à droite)

4.3.2.2 Préparation des solutions à tester

Des solutions mères à 1 g/L de chaque molécule sont préparées dans de l'eau ultra-pure par pesée et conservées à 4 °C. Dans le cas du CMI, étant donnée sa plus faible solubilité dans l'eau, une solution mère à 1 g/L dans du méthanol est utilisée. Les solutions à tester sont réalisées par dilution des solutions mères dans du milieu E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mgSO₄) ajusté si besoin à pH 7-7,5 et utilisées au plus tard le lendemain.

4.3.2.3 Observations réalisées

Les observations consignées sont les suivantes : éclosion (aux 1^{er} et 2^{ème} jours d'exposition), survie (à 48 h, 72 h et 6 jours), présence de malformation/œdème, capacité de réponse à un stimulus tactile codé par un indice (0 = aucun mouvement ; 1 = mouvement d'évitement limité ; 2 = tour complet du puits). La mesure de mobilité rend compte des capacités sensibles et motrices. Le score de mobilité correspond à la somme des indices attribués aux larves d'une même condition ; l'indice moyen correspond au score divisé par le nombre de larves vivantes. À partir de ces observations, il est possible d'évaluer des EC₅₀ (concentration d'une substance induisant 50 % de l'effet maximum).

4.3.3 Expérimentations réalisées

Sept conservateurs ont été testés : le méthyl-parabène (MeP), la méthylisothiazolinone (MIT), la méthylchlorisothiazolinone (CMI), le 2-phénoxyéthanol (PE), la chlorphénésine (CPN), l'alcool benzylique et l'acide benzoïque. L'objectif étant de comparer l'effet des parabènes à leurs substituants, les courbes dose-réponse ont été déterminées pour chaque substance seule, puis certains mélanges ont été testés.

4.3.3.1 Courbes dose-réponse des molécules seules

Chaque molécule a été testée entre 0 et 100 mg/L en ajustant, en fonction des premiers effets observés, les concentrations intermédiaires.

4.3.3.2 Courbes dose-réponse des molécules en mélange avec le phénoxyéthanol

Le phénoxyéthanol est très souvent utilisé dans les produits cosmétiques pour amplifier l'effet des autres conservateurs. Lundov et al. (2011) ont montré que la concentration nécessaire de certains des conservateurs les plus fréquemment utilisés pouvait ainsi être diminuée par l'association du phénoxyéthanol. Ces auteurs ont mis en évidence des effets additifs voire synergiques du mélange de conservateurs du fait que le site d'action bactéricide du phénoxyéthanol est la membrane cellulaire où il provoque une augmentation de la perméabilité (Scognamiglio et al., 2012). Cela implique que même si le phénoxyéthanol ne semble pas induire d'effet toxique à court terme dans le milieu aquatique, combiné à d'autres

polluants, il pourrait en potentialiser les effets en augmentant leur bioabsorption (*Ethers de glycol*, 1999).

C'est pourquoi, après avoir évalué l'effet des substances seules sur le développement du poisson zèbre, l'effet du phénoxyéthanol sur les courbes dose-réponse des autres substances a été testé. Le phénoxyéthanol étant autorisé à 1 % dans les produits cosmétiques et le méthylparabène à 0,4%, il a été décidé de tester un ratio PE/MePB constant égal à 2.

4.3.3.3 Courbes dose-réponse d'un mélange de substances

Après avoir testé les substances seules, puis en mélange avec le phénoxyéthanol, l'objectif de cette troisième expérimentation sera d'évaluer le potentiel toxique du mélange de substances à plusieurs concentrations. La proportion de chaque substance l'une par rapport à l'autre sera établie, comme au paragraphe précédent, par rapport aux concentrations classiquement utilisées dans la formulation des cosmétiques.

Références bibliographiques

- Alvarez-Rivera, G., Dagnac, T., Lores, M., Garcia-Jares, C., Sanchez-Prado, L., Lamas, J.P., Llompart, M., 2012. Determination of isothiazolinone preservatives in cosmetics and household products by matrix solid-phase dispersion followed by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1270, 41–50. doi:10.1016/j.chroma.2012.10.063
- Aoyama, A., Doi, T., Tagami, T., Kajimura, K., 2014. Simultaneous Determination of 11 Preservatives in Cosmetics by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 52, 1010–1015. doi:10.1093/chromsci/bmt144
- Baranowska, I., Wojciechowska, I., 2013. The determination of preservatives in cosmetics and environmental waters by HPLC. *Polish Journal of Environmental Studies* 22, 1609–1625.
- Bollmann, U.E., Tang, C., Eriksson, E., Jönsson, K., Vollertsen, J., Bester, K., 2014. Biocides in urban wastewater treatment plant influent at dry and wet weather: Concentrations, mass flows and possible sources. *Water Research* 60, 64–74. doi:10.1016/j.watres.2014.04.014
- Bressy, A., Carré, C., Deroubaix, J.-F., de Gouvello, Bernard, Le Roux, J., Marconi, A., Soyer, M., Moilleron, R., 2015. Livrable 1.3 du projet Cosmet'eau : État de l'art sur les résidus de cosmétiques dans les milieux aquatiques - Les outils de surveillance et de contrôle (Livrable du projet Cosmet'eau).
- Darbre, P.D., Aljarrah, A., Miller, W.R., Coldham, N.G., Sauer, M.J., Pope, G.S., 2004. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.* 24, 5–13. doi:10.1002/jat.958
- Di Paolo, C., Ottermanns, R., Keiter, S., Ait-Aissa, S., Bluhm, K., Brack, W., Breitholtz, M., Buchinger, S., Carere, M., Chalon, C., Cousin, X., Dulio, V., Escher, B.I., Hamers, T., Hilscherová, K., Jarque, S., Jonas, A., Maillot-Marechal, E., Marneffe, Y., Nguyen, M.T., Pandard, P., Schifferli, A., Schulze, T., Seidensticker, S., Seiler, T.-B., Tang, J., van der Oost, R., Vermeirssen, E., Zounková, R., Zwart, N., Hollert, H., 2016. Bioassay battery interlaboratory investigation of emerging contaminants in spiked water extracts – Towards the implementation of bioanalytical monitoring tools in water quality assessment and monitoring. *Water Research* 104, 473–484. doi:10.1016/j.watres.2016.08.018
- Emestox, 2013. Livrable D 4.5 - Utilisation et performances des membranes polymériques pour l'échantillonnage passif de composés organiques hydrophobes : paramètres cinétiques, méthodes pour la quantification des concentrations dans le milieu.
- Ethers de glycol: quels risques pour la santé?, 1999. . INSERM, Paris.
- Fernandez, X., Merck, Florence, Kerdudo, A., 2012. Conservateurs pour cosmétiques - Généralités et conservateurs antimicrobiens. *Techniques de l'ingénieur* 1–21.
- Ficheux, A.S., Chevillotte, G., Wesolek, N., Morisset, T., Dornic, N., Bernard, A., Bertho, A., Romanet, A., Leroy, L., Mercat, A.C., Creusot, T., Simon, E., Roudot, A.C., 2016. Consumption of cosmetic products by the French population second part: Amount data. *Food and Chemical Toxicology* 90, 130–141. doi:10.1016/j.fct.2016.02.008
- Ficheux, A.S., Wesolek, N., Chevillotte, G., Roudot, A.C., 2015. Consumption of cosmetic products by the French population. First part: Frequency data. *Food and Chemical Toxicology* 78, 159–169. doi:10.1016/j.fct.2015.01.016

- Gasperi, J., Geara, D., Lorgeoux, C., Bressy, A., Zedek, S., Rocher, V., El Samrani, A., Chebbo, G., Moilleron, R., 2014. First assessment of triclosan, triclocarban and paraben mass loads at a very large regional scale: Case of Paris conurbation (France). *Science of The Total Environment* 493, 854–861. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.079
- Geara-Matta, D., 2012. Flux et sources des parabènes, du triclosan et du triclocarban en milieux urbains denses : comparaison entre Paris et Beyrouth. thèse de doctorat de l'Université Paris-Est.
- Geara-Matta, D., 2012. Flux et sources des parabènes, du triclosan et du triclocarban en milieux urbains denses : comparaison entre Paris et Beyrouth. Université Paris-Est, Champs-sur-Marne.
- Gören, A.C., Bilsel, G., Şimşek, A., Bilsel, M., Akçadağ, F., Topal, K., Ozgen, H., 2015. HPLC and LC–MS/MS methods for determination of sodium benzoate and potassium sorbate in food and beverages: Performances of local accredited laboratories via proficiency tests in Turkey. *Food Chemistry* 175, 273–279. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.094
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Lebo, J.A., Almeida, F.V., Booij, K., Alvarez, D.A., Clark, R.C., Mogensen, B.B., 2002. Development of the permeability/performance reference compound approach for in situ calibration of semipermeable membrane devices. *Environ. Sci. Technol.* 36, 85–91. doi:10.1021/es010991w
- Ineris, 2015. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : parabènes (No. DRC-15-136881-10349A).
- Kibbey, T.C.G., Paruchuri, R., Sabatini, D.A., Chen, L., 2007. Adsorption of Beta Blockers to Environmental Surfaces. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5349–5356. doi:10.1021/es070152v
- Kim, T.H., Kim, M.G., Kim, M.G., Shin, B.S., Kim, K.-B., Lee, J.B., Paik, S.H., Yoo, S.D., 2015. Simultaneous determination of phenoxyethanol and its major metabolite, phenoxyacetic acid, in rat biological matrices by LC–MS/MS with polarity switching: Application to ADME studies. *Talanta* 144, 29–38. doi:10.1016/j.talanta.2015.05.075
- Kimura, K., Kameda, Y., Yamamoto, H., Nakada, N., Tamura, I., Miyazaki, M., Masunaga, S., 2014. Occurrence of preservatives and antimicrobials in Japanese rivers. *Chemosphere* 107, 393–399. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.01.008
- Mintel database, 2015. Global market research and market insight. <http://www.mintel.com>.
- OCDE, n.d. Essai n° 236 : Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire. doi:<http://dx.doi.org/10.1787/9789264203716-fr>
- Perron, M.M., Burgess, R.M., Suuberg, E.M., Cantwell, M.G., Pennell, K.G., 2013. Performance of passive samplers for monitoring estuarine water column concentrations: 1. Contaminants of concern: Performance of passive samplers for monitoring contaminants of concern. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 2182–2189. doi:10.1002/etc.2321
- Rafoth, A., Gabriel, S., Sacher, F., Brauch, H.-J., 2007. Analysis of isothiazolinones in environmental waters by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1164, 74–81. doi:10.1016/j.chroma.2007.07.040
- Sacks, V.P., Lohmann, R., 2011. Development and use of polyethylene passive samplers to detect triclosans and alkylphenols in an Urban estuary. *Environmental Science and Technology* 45, 2270–2277.
- Scognamiglio, J., Jones, L., Letizia, C.S., Api, A.M., 2012. Fragrance material review on 2-phenoxyethanol. *Food and Chemical Toxicology* 50, S244–S255. doi:10.1016/j.fct.2011.10.030

- Soetaert, K., Petzoldt, T., others, 2010. Inverse modelling, sensitivity and monte carlo analysis in R using package FME. *Journal of Statistical Software* 33, 1–28.
- Speksnijder, P., van Ravestijn, J., de Voogt, P., 2010. Trace analysis of isothiazolinones in water samples by large-volume direct injection liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 5184–5189. doi:10.1016/j.chroma.2010.06.010
- Tamura, I., Kagota, K.-I., Yasuda, Y., Yoneda, S., Morita, J., Nakada, N., Kameda, Y., Kimura, K., Tatarazako, N., Yamamoto, H., 2013. Ecotoxicity and screening level ecotoxicological risk assessment of five antimicrobial agents: triclosan, triclocarban, resorcinol, phenoxyethanol and p-thymol. *J Appl Toxicol* 33, 1222–1229. doi:10.1002/jat.2771
- Wibbertmann, A. (Ed.), 2000. Benzoic acid and sodium benzoate, Concise international chemical assessment document. World Health Organization, Geneva.
- Wittenberg, J.B., Canas, B.J., Zhou, W., Wang, P.G., Rua, D., Krynitsky, A.J., 2015. Determination of methylisothiazolinone and methylchloroisothiazolinone in cosmetic products by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Liquid Chromatography. *Journal of Separation Science* 38, 2983–2988. doi:10.1002/jssc.201500365
- Wu, S., Kusch, P., Brix, H., Vymazal, J., Dong, R., 2014. Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: A nitrogen and organic matter targeted review. *Water Research* 57, 40–55. doi:10.1016/j.watres.2014.03.020
- Zhu, H., Zhang, W., Yang, Y., Zhu, Y., 2014. Analysis of the preservative chlorphenesin in cosmetics by high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Chromatography (Se Pu)* 32, 95–99. doi:10.3724/SP.J.1123.2013.07036

Annexe 1 : analyse de sensibilité du modèle de calibration des membranes polymériques et intégration des équations du modèle

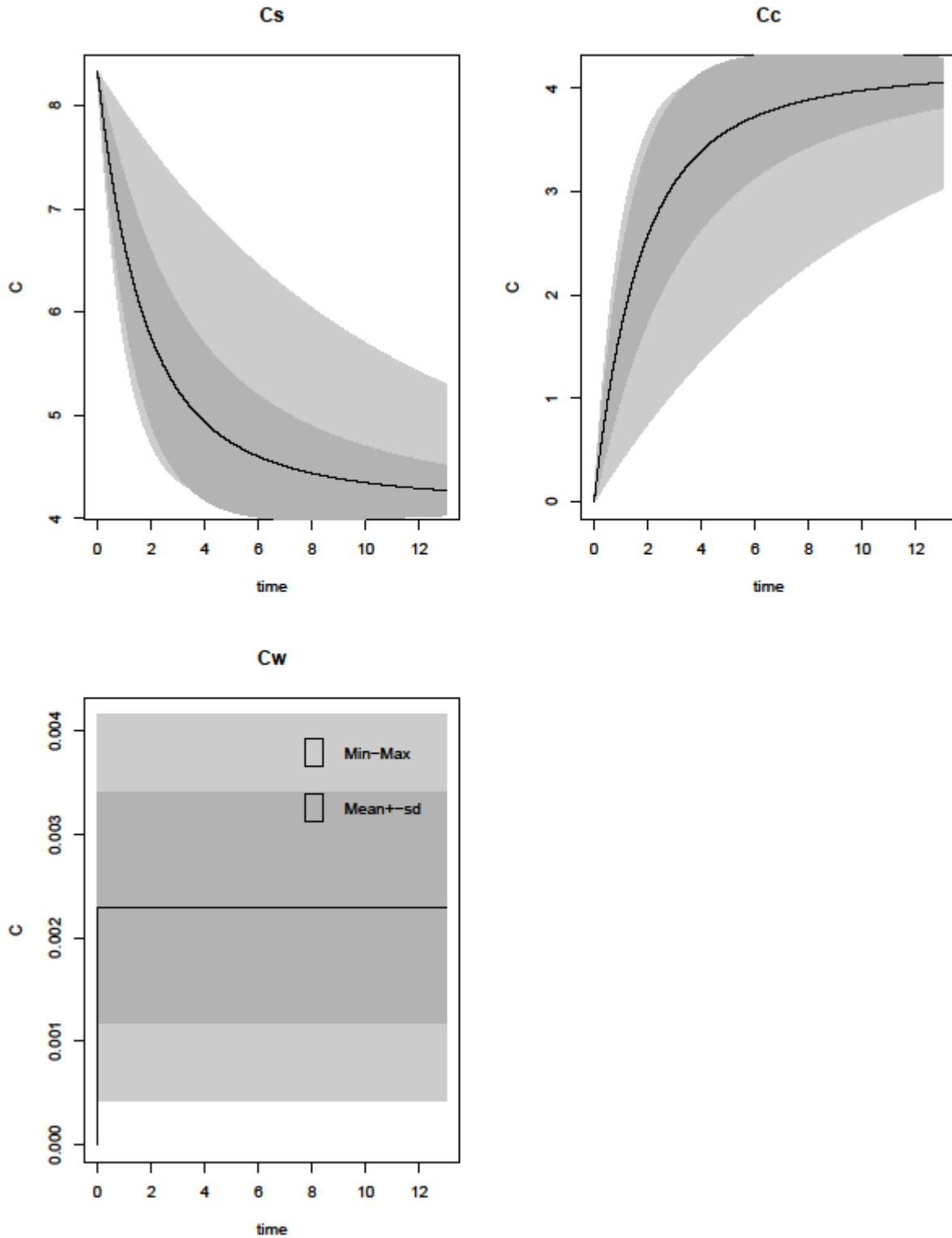


Figure supplémentaire 1 : Variation de Cs, Cc et Cw lorsque k_e varie entre 1,1 et 1 (moyenne, min, max et moyenne \pm écart-type)

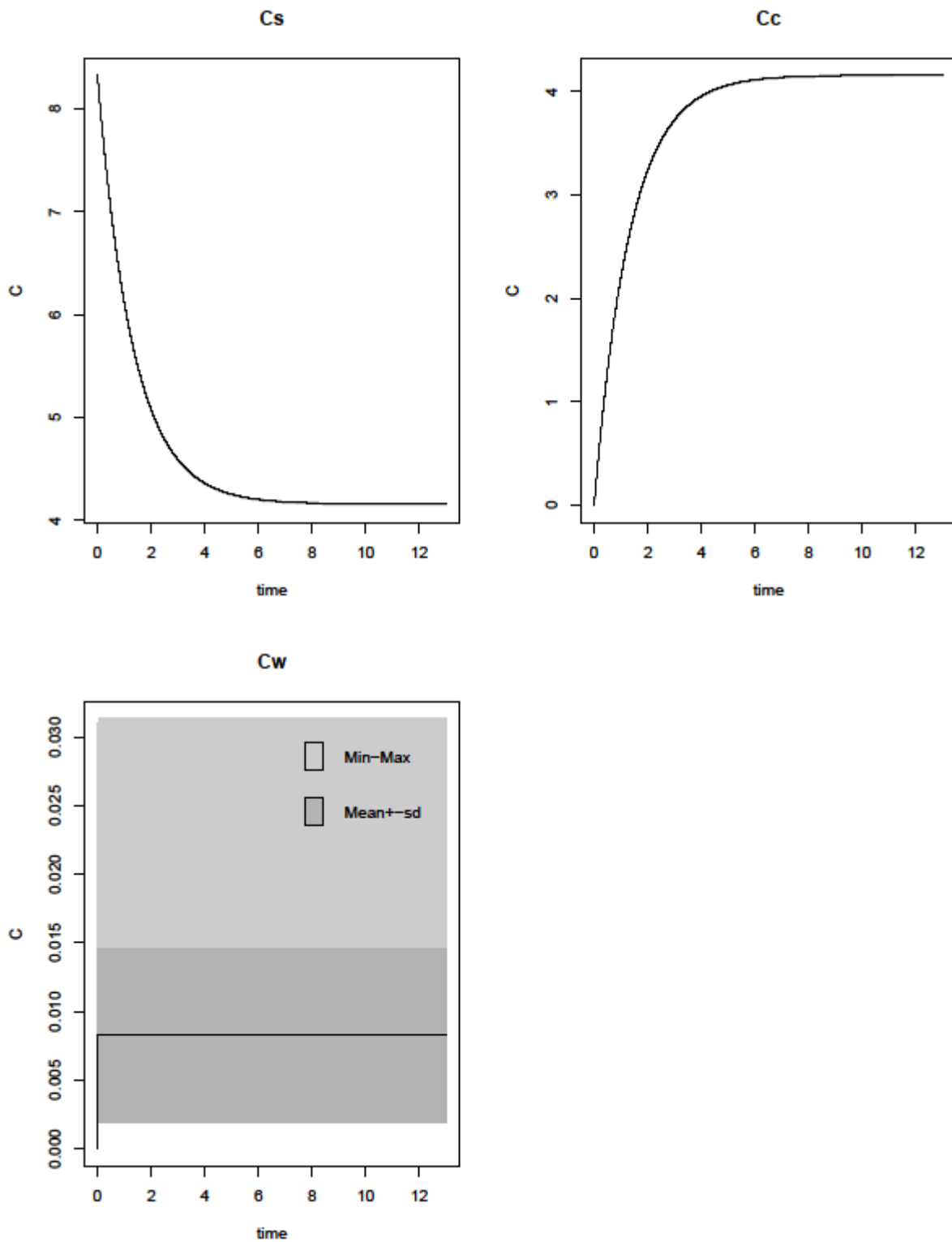


Figure supplémentaire 2 : Variations de Cs, Cc et Cw lorsque k_u varie entre 100 et 1000 (moyenne, min, max et moyenne \pm écart-type)

Les Figure supplémentaire 1 et Figure supplémentaire 2 montrent que C_s et C_c sont peu sensibles à la valeur du k_u . Ce résultat peut être prouvé analytiquement à partir des équations du modèle et en faisant l'hypothèse que C_w atteint très rapidement l'équilibre (ce qui est vrai pour les valeurs de k_u et k_e estimées pour le TCS et le TCC).

Si C_w est considéré comme constant alors : $\frac{dC_w}{dt} = k_u C_w = \frac{1}{2} k_e (C_s + C_c) = 0$

Alors : $k_u C_w = \frac{1}{2} k_e (C_s + C_c)$

Donc les équations du modèle deviennent

$$\begin{aligned}\frac{dC_s}{dt} &= -k_e C_s + \frac{1}{2} k_e (C_s + C_c) = \frac{1}{2} k_e (C_c - C_s) \\ \frac{dC_c}{dt} &= -k_e C_c + \frac{1}{2} k_e (C_s + C_c) = -\frac{1}{2} k_e (C_c - C_s) \\ \frac{dC_w}{dt} &= 0\end{aligned}$$

Ce système a pour solution analytique

$$\begin{aligned}C_c(t) &= \frac{1}{2} (C_s^0 - C_w) e^{-k_e t} (-1 + e^{k_e t}) \\ C_s(t) &= \frac{1}{2} (C_s^0 - C_w) e^{-k_e t} (1 + e^{k_e t})\end{aligned}$$

On voit donc que les variations de C_c et C_s ne dépendent plus que de la concentration dans l'eau, considérée comme constante rapidement, et k_e .