

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE BLIDA 1

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

UNIVERSITE  
SAAD DAHLAB BLIDA  
FACULTE DE MEDECINE



Thèse

# Parabènes dans les préparations liquides non stériles

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Session : juillet 2020

Présentée par :

**Mr. Saidani Oussama**

**Mr. Belmokhtar Oussama**

**Mr. Zerrouk Abderrezak**

Les membres du jury :

**-Présidente : Dr Imoudeche**

**-Examineur 1 : Dr. Mahfoud**

**-Examineur 2 : Dr. Benchakroun**

**-Promoteur : Dr. Benghezal Maître-assistant en Biophysique Pharmaceutique**

## *Remerciements*

*Chaque jour qui passe, nous remercions le Dieu, et nous le prions tout le temps de nous donner la force de suivre le chemin qu'il nous a tracé afin de mener à bien le destin qu'il nous a prévu.*

*Nos premiers remerciements reviennent à Nos très chers parents que nous aimons et qui nous ont soutenus tout au long de nos années d'études scolaires et universitaires. Vous avez toujours été présents, jamais fatigués quel que soit la situation. Vous nous êtes donné la force d'avancer et de toujours garder la tête haute.*

*Nous tenons à remercier notre promoteur, Docteur Benghezal Islam qu'il est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi que pour l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer, pour sa patience, sa disponibilité et surtout son judicieux conseil, qui a contribué à alimenter nos réflexions.*

*Nous remercions aussi le président de jury, Dr Imoudeche, et les membres de jury Dr Mahfoud , Dr Benchakroun, qui ont bien voulu accepter de valoriser ce travail malgré ses charges professionnelles.*

# Sommaire

Liste des tableaux.....	VI
Liste des figures .....	VII
Liste des abréviations.....	IX
<b><u>Introduction</u></b> .....	<b>01</b>
<b><u>1. généralité sur les Parabènes</u></b> .....	<b>03</b>
1.1. Définition.....	03
1.2. Structure chimique .....	03
1.3. Propriétés physico-chimiques .....	05
1.4. Propriétés typiques .....	06
1.5. Les différentes sources de parabènes .....	07
1.5.1. Les sources naturelles .....	07
1.5.2. Les sources artificielles.....	09
1.6. Mode d'obtention.....	09
1.6.1. Synthèse industrielle.....	09
1.6.2. Biosynthèse.....	11
1.7. Réglementation et exposition .....	13
1.7.1. Réglementation.....	13
1.7.1.1. Dans le domaine alimentaire .....	13
1.7.1.2. Dans les cosmétiques.....	14
1.7.1.3. Dans les médicaments.....	15
1.7.2. Estimation de l'exposition quotidienne .....	18

1.8. Noms commerciaux des parabènes .....	18
1.9. Les principaux parabènes utilisés.....	19
1.9.1. Méthylparabène.....	19
1.9.2. Ethylparabène.....	20
1.9.3. Propylparabène.....	20
1.9.4. Butylparabène.....	21
<b>2. <u>Les Parabènes dans les préparations liquides nos steriles:</u>.....</b>	<b>24</b>
2.1. Rôle des parabènes dans la stabilité microbienne des médicaments .....	24
2.1.1. Mécanisme d'action.....	25
2.1.2. Les concentrations utilisées .....	27
2.1.3. Utilisation en association.....	28
2.2. Pharmacocinétique.....	29
2.2.1. Absorption .....	29
2.2.2. Métabolisme.....	30
2.2.3. Excrétions .....	31
2.3. Étude de toxicité.....	32
2.3.1. Toxicité aigue.....	32
2.3.2. Toxicité sub-chronique.....	32
2.3.3. Toxicité chronique / Carcinogénicité .....	33
2.3.4. Génotoxicité.....	34
2.3.5. Tératogénicité.....	34
2.3.6. Cytotoxicité.....	35
2.3.7. Activité oestrogénique des parabènes .....	36

2. 3.8. Effets sur le system reproducteur mâle .....	39
2.3.9. Implication dans le cancer di sein .....	40
2. 3.10. Neurotoxicité .....	41
2.3.11. Vieillessement cellulaire photo-induit .....	42
2.4. Avantages des parabènes.....	43
2.5. Limites des parabènes.....	44
2.6. Autres effets des parabènes.....	45
2.6.1. Effets myorelaxant.....	45
2. 6.2. Effets anesthésique.....	45
2.6.3. Effet sur les canaux sodiums voltage-dépendants.....	45
2.6.4. Effet anti bactérien contre les caries .....	46
2.6.5. Effet antioxydant.....	46
2.6.6. Effet bronchodilatateur .....	46
2.7. Analyse des Parabènes dans les produits pharmaceutiques .....	47
2.7.1. Définition.....	47
2. 7.2. Les méthodes les plus utilisées.....	47
2.7.2.1 Électrophorèse capillaire .....	47
2.7.2.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC.....	49
2.7.2.3 Chromatographie sur couche mince .....	51
2.7.2.4 Spectrophotométrie UV-visible .....	54
3. <u>Alternatives aux usages des parabens</u> .....	57
3.1. La mention « Sans Parabènes » : ça veut dire quoi ? .....	57
3.1.1. Sans parabène = Sans conservateur.....	57
3.1.2. Sans parabène = Avec d'autre conservateur.....	57
3.1.3. Sans parabène = Sans parabène ajouté.....	57
3.2. Loi anti parabène (Loi Lachaud).....	58

<b>3.3. Les recommandations émises par les Autorités de santé et les instances scientifiques.....</b>	<b>58</b>
<b>3.3.1. Food and Drug Administration.....</b>	<b>58</b>
<b>3.3.2. European Medicine Agency .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3.3. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3.4. Académie Nationale de Pharmacie.....</b>	<b>61</b>
<b>3.4. Alternatives proposées.....</b>	<b>61</b>
<b>3.4.1. Dans les médicaments.....</b>	<b>62</b>
<b>3.4.1.1. L'association de conservateur.....</b>	<b>62</b>
<b>3.4.1.2. Les méthodes physiques de conservation.....</b>	<b>62</b>
<b>3.4.2. Dans les produits cosmétiques.....</b>	<b>63</b>
<b>3.4.2.1. Alternatives chimiques.....</b>	<b>63</b>
<b>3.4.2.2. Alternatives techniques.....</b>	<b>67</b>
<b>3.4.2.3. Adaptation des formulations : Autoprotection.....</b>	<b>69</b>
<b>3.4.2.4. Les alternatives naturelles.....</b>	<b>72</b>
<b><u>Conclusion</u>.....</b>	<b>77</b>

## Table des matières

<b>Tableau 1:</b> Caractéristiques physico-chimiques des parabènes.....	5
<b>Tableau 2:</b> Pourcentage d'acide parahydroxybenzoïque en fonction du sel d'après Lindsey et Jeskey et al.....	11
<b>Tableau 3:</b> quelques noms commerciaux associés aux différents parabènes étudiés.....	18
<b>Tableau 4:</b> Quelques exemples de spécialités contenant des parabènes classés selon la voie et la forme d'administration.....	24
<b>Tableau 5:</b> concentration efficace des parabens.....	26
<b>Tableau 6:</b> Effet œstrogénique quantitatif des parabènes.....	37
<b>Tableau 7:</b> Tableau résumant les résultats de l'activité œstrogénique des parabènes.....	38
<b>Tableau 8:</b> Concentrations moyennes des parabènes détectés dans les tissus tumoraux mammaires.....	40
<b>Tableau 9:</b> Valeurs d'aw minimales permettant la croissance de microorganismes représentatifs, à 25°C.....	70
<b>Tableau 10:</b> Domaines de pH de croissance des microorganismes.....	71

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Structure chimique des parabènes.....	4
<b>Figure 2 :</b> Structures des principaux parabènes.....	4
<b>Figure 3 :</b> Photographie de poudre de Methylparabène.....	5
<b>Figure 4:</b> Cloudberry, fruit de la plante <i>Rubus chamaemorus</i> .....	8
<b>Figure 5 :</b> Vanille Bourbon.....	8
<b>Figure 6:</b> Réaction de Kolbe-Schmitt.....	9
<b>Figure 7:</b> Mécanisme de la réaction de kolbe-Schmitt.....	10
<b>Figure 8:</b> Zone d'inhibition de la souche A4B-17 contre <i>Bacillus subtilus</i> .....	12
<b>Figure 9 :</b> photographie montre la présence de méthyleparaben dans de Lipikar Syndet.....	15
<b>Figure 10 :</b> Photographie de l'emballage de Gentaxyn.....	17
<b>Figure 11:</b> photographie montre la mention de méthylparaben et de propylparaben comme un excepien à effet notoire dans le Diprostène.....	17
<b>Figure 12:</b> Schéma de pharmacocinétique des parabènes établi d'après les tests sur l'animal.....	31
<b>Figure 13:</b> réaction de dégraion de méthylparaben sous l'action de l'UVB.....	42
<b>Figure 14:</b> Schéma du système d'électrophorèse capillaire.....	48
<b>Figure 15:</b> Schéma du principe du HPLC.....	49
<b>Figure 16:</b> Appareillage simplifié de l'HPLC.....	50
<b>Figure 17:</b> Schéma de principe du CCM.....	52
<b>Figure 18:</b> Appareillage d'une chromatographie sur couche mince.....	53
<b>Figure 19:</b> Schéma du principe de spectrophotométrie UV-visible.....	54
<b>Figure 20 :</b> Evolution de la nature du conservateur et de la concentration utilisée dans les produits cosmétiques analysés par la société COSMEPAR entre 2010 et 2013.....	64

<b>Figure 21</b> : <i>Structure chimique du Methylisothiazolinone (MIT)</i> .....	<b>64</b>
<b>Figure 22</b> : Structure chimique du phénoxyéthanol.....	<b>66</b>
<b>Figure 23</b> : Monodoses stériles de démaquillants yeux Toleriane de LaRoche-Posay®.....	<b>67</b>
<b>Figure 24</b> : Le système Airless est exploité dans le soin Toleriane Ultra de LaRoche-Posay®, présenté en flacon pomp.....	<b>68</b>
<b>Figure 25</b> : Flacon pompe du soin Toleriane Ultra de LaRoche-Posay® .....	<b>68</b>
<b>Figure 26</b> : Différents logos en place sur les flacons d'huiles essentielles certifiant leur qualité .....	<b>73</b>

## Liste des abréviations

**AFSSAPS** : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

**AFNOR** : Association française de normalisation

**AMM** : Autorisation de mise sur le marché

**ANSM**: Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

**Aw** : Activité de l'eau : water activity

**A.B**: Agriculture biologique

**AFSSA**: Agence française de sécurité sanitaire des aliments

**BP** : Pharmacopée britannique

**BPF** : Bonnes pratiques de fabrication.

**Bio**: biologique

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**CE** : Conformité européenne

**CE** : Electrophorèse capillaire électrocinétique

**CMR** : Des agents cancérigènes, mutagènes, toxique pour la reproduction

**CFTA**: Association des cosmétiques, produits de toilette et parfums

**DMP**: Direction du Médicament et de la Pharmacie

**DJA**: Dose Journalière Admissible

**DJE** : Dose Journalière d'Exposition

**EEN** : Excipient à effet notoire

**EP** : Pharmacopée européenne

**Ema** : Agence Européenne des Médicaments

**FDA** : Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments

**Fig.:** Figure

**FD&C Act:** La Federal Food, Drug, and Cosmetic Act

**HECT:** Huile Essentielle Chémotypée

**H.E.B.B.D:** Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie

**HECT:** Huile Essentielle Chémotypée

**MIT:** MethylIsoThiazolinone

**OGM:** organismes génétiquement modifiés

**PE** : Perturbateurs Endocriniens

**Ph. Eur.** : Pharmacopée Européenne

**REACH:** Enregistrement, Evaluation, autorisation et restriction des produits Chimiques

**SCCP:** Comité scientifique des produits de consommation

**SCCS:** Scientific Committee on Consumer Safety

**SCC:** Scientific Committee on Consumer Safety

**SFD:** Société Française de Dermatologie

**UHT** : Ultra Haute Températ

**Les formes liquides** du fait de leur **teneur élevée** en **eau** sont souvent favorables au développement **des micro- organismes**. Ainsi pour les stabiliser les fabricants font appel à des conservateurs **tels que les parabènes** qui sont des esters de l'acide para hydroxybenzoïque et qui diffèrent par la nature du groupement alkyle. **(1)**

Les parabènes sont des substances utilisées comme conservateurs pour empêcher le développement des **bactéries** et des **champignons** par leurs **propriétés antibactériennes** et **antifongiques**. **(2)**

A ce jour, les Parabènes sont des conservateurs controversés ; la mention « **sans Parabène** » est devenue un argument de vente largement employé par les fabricants.

En effet, la polémique concernant ces conservateurs a commencé en 2004, suite à la publication d'une étude britannique (Darbre *et al.*, 2004) faisant état d'un lien possible entre l'utilisation de produits cosmétiques contenant des Parabènes et le développement de cancers du sein.

Fort discutée par la communauté scientifique, cette étude n'en a pas moins connu un large écho auprès des consommateurs inquiets, et a très opportunément mené à une réévaluation en profondeur de **la toxicité** des Parabènes.

Suite à ces préoccupations montantes, les agences européennes ont demandé des études complémentaires. Fin 2005 arrivèrent les conclusions de ces évaluations : elles recommandent la poursuite de l'utilisation de certains Parabènes étudiés (méthyl, propyl, éthyl, butyl), qui présentent d'excellentes garanties d'innocuité associées à une très bonne efficacité antimicrobienne, et sont difficilement remplaçables.

Nous ferons une **description complète** des Parabènes, tout en évaluant leurs **avantages**, leurs **inconvenients**, leur **toxicité**. Enfin nous aborderons les **méthodes d'analyse** des Parabènes dans les produits pharmaceutiques et **les alternatives proposées**.

Chapitre 1 :  
généralités sur les  
Parabènes

## 1. Généralités sur les Parabènes :

### **1.1.Définition :**

Les Parabènes constituent un groupe de produits organiques : les esters d'acide p-hydroxybenzoïque.

Leur première utilisation en tant que conservateur remonte à 1920. Au départ les Parabènes sont apparus pour remplacer d'autres conservateurs : les formaldéhydes trop dangereux, et dont l'usage dans les cosmétiques est désormais restreint aux vernis à ongle.

Selon la définition de la Communauté Européenne et la directive 95/2/CE, on entend par conservateur toute substance « qui prolonge la durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations dues aux micro-organismes ». **(3)**

Du fait de leur activité effective antibactérienne et antimycosique, ils sont utilisés comme antimicrobiens dans des aliments, les boissons, les cosmétiques et les **produits pharmaceutiques**.

### **1.2.Structure chimique :**

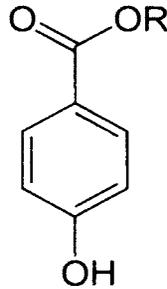
Sous le nom générique de Parabènes sont réunis les esters de l'acide para-hydroxybenzoïque ou parahydroxybenzoates (PHB), ainsi que leurs dérivés sodiques **(4)**.

Les Parabènes résultent de l'estérification en C4 de l'acide para-hydroxybenzoïque par un alcool, en présence d'un catalyseur acide :

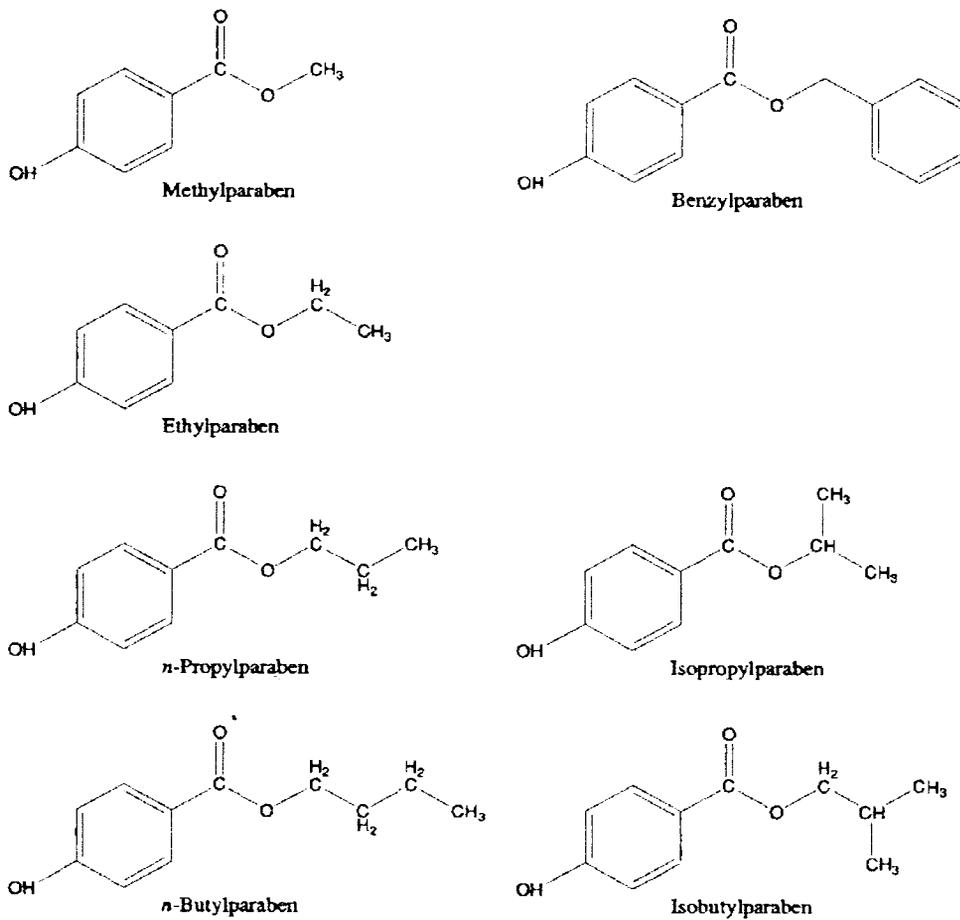
- Méthanol : PHB de méthyle ou méthylparabène
- Ethanol : PHB d'éthyle ou éthylparabène
- Propanol : PHB de propyle ou propylparabène
- Isopropanol : PHB d'isopropyle ou isopropylparabène
- Butanol : PHB de butyle ou butylparabène
- Isobutanol : PHB d'isobutyle ou isobutylparabène
- Hexanol : PHB d'hexyle ou hexylparabène
- Isodécanol : PHB d'isodécyle ou isodécylparabène
- Alcool benzylique : PHB de benzyle ou benzylparabène
- Phénoxyéthanol : PHB de phénoxyéthyle ou phénoxyéthylparabène

- Hexamidine : PHB d'hexamidine ou hexamidineparabène (sel)
- Ces esters existent sous forme de sels sodiques, potassiques ou calciques (5).

La figure ... présente les structures chimiques des principaux Parabènes.



**Figure 1 :** Structure chimique des Parabènes.



**Figure 2 :** Structures des principaux Parabènes (7).

### 1.3. Propriétés physico-chimiques:

Les Parabènes se présentent comme des petits cristaux incolores ou des poudres cristallines blanches ou sensiblement blanches, inodores et insipides ou possèdent un léger goût de brûlé (8).

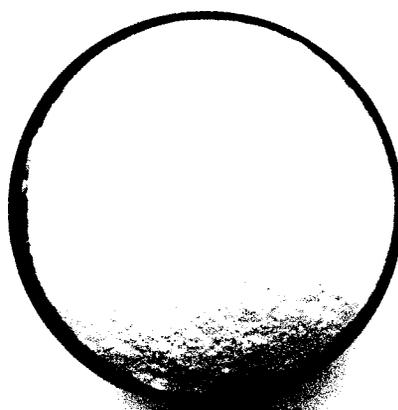


Figure 3 : Photographie de poudre de Methylparabène (9)

Les principales caractéristiques physico-chimiques des Parabènes sont présentées dans le tableau suivant:

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques des parabènes (10)

Caractéristiques	APHB	MeP	EtP	PrP	BuP	BzP
Poids moléculaire (g/mol)	138,12	152,15	254,38	180,21	194,23	228,24
Point de fusion (°C)	213	131	117	97	68,5	110
Point d'ébullition (°C)	250	275	297,5	285,14	300,26	-
Pression de vapeur à 25°C (Pa)	-	0,114	0,01239	0,04093	0,0334	-
Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/L)	5000	2500	885	500	207	160
Log $K_{ow}$	-	1,96	2,47	3,04	3,57	3,61
$pK_a$	2,7	8,31	8,31	8,23	8,22	8,37

Les molécules de la famille des parabènes sont faiblement solubles dans l'eau. En revanche, ces molécules sont extrêmement solubles dans les solvants tels que les alcools, l'acétone et l'éther. La solubilité décroît lorsque la longueur de la chaîne alkyle s'allonge et augmente avec la température (11).

Le coefficient de partage octanol-eau ( $\log K_{ow}$ ) augmente en fonction de l'accroissement de la longueur de la chaîne alkyle. Il permet d'évaluer l'accumulation possible des molécules dans les tissus vivants. Pour les Parabènes, celle-ci paraît faible mais semble augmenter de façon proportionnelle avec la longueur de la chaîne alkyle.

Les valeurs de pKa oscillent entre 8,22 et 8,37 selon les Parabènes. Le pH de l'eau étant en général de l'ordre de 7, les parabènes se trouvent sous leur forme acide dans ce milieu.

La pression de vapeur saturante à 25°C largement inférieure à 100 Pa montre que les Parabènes sont des composés très peu volatils.

Les points d'ébullition des Parabènes sont assez élevés. Ceci montre une certaine stabilité des molécules. Les points de fusions différents pour chaque Parabène permettent de les identifier.

Les sels de sodium sont très hygroscopiques et leur dégradation par hydrolyse transforme le Parabène en acide para-hydroxybenzoïque et en alcool, puis en phénol par décarboxylation (12).

#### 1.4. Propriétés typiques :

- Les Parabènes présentent une activité antimicrobienne d'un pH de **4 à 8**. Leur efficacité diminue avec l'augmentation du pH en raison de la formation de l'anion phénolate.
- Les Parabènes sont plus actifs contre **les levures** et les **champignons** que contre les bactéries. Ils sont également plus actifs contre les bactéries à **Gram +** que contre les bactéries à **Gram -**
- L'activité des Parabènes augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne du fragment alkyle, et peut être améliorée en utilisant des combinaisons de Parabènes au

moment où des effets synergiques se produisent. Par conséquent, des combinaisons de MP, EP, PP, BP sont souvent utilisées ensemble (Exemple : **Maxilase<sup>®</sup>** ;sirop , **Maalox<sup>®</sup>** ;suspension buvable contient le méthylparabène + propylparabène)

- L'activité est renforcée par l'addition d'autres excipients tels que : **le propylène glycol** (2–5%), **l'alcool phényléthylique** et **l'acide édétique** (13).
- En raison de la faible solubilité des Parabènes, **les sels de Parabènes** (En particulier le sel de sodium) sont plus fréquemment utilisés dans les formulations.
- Le méthylparabène (0,18%) avec le propylparabène (0,02%) sont aussi utilisés pour la conservation de diverses formulations pharmaceutiques parentérales. (14) (Exemple : **gentalline<sup>®</sup>** ;Injectable ) et crèmes ( **BIAFINE<sup>®</sup>** ; crème)

---

#### **Médicaments**

Crèmes, pommades, lotions, ovules, suppositoires, solutions injectables, nasales, ophtalmiques, auriculaires, comprimés, sirops...

---

#### **Produits cosmétiques**

Très nombreux produits d'hygiène, de soins et de maquillage, crèmes dépilatoires, crèmes solaires, dentifrices, déodorants, gels, poudres, savons, shampoings, teintures capillaires, crèmes amincissantes, antirides...

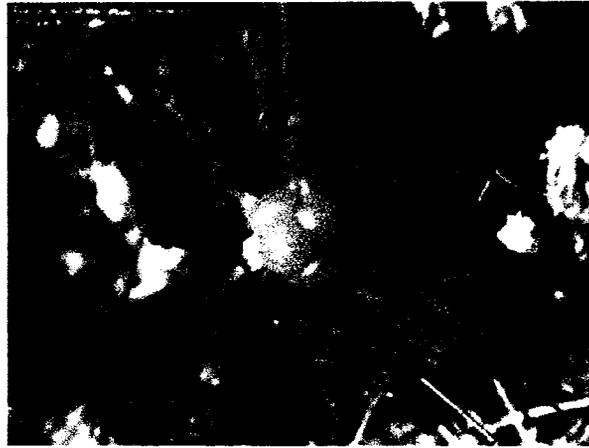
---

### **1.5. Les différentes sources de Parabènes:**

#### **1.5.1. Les sources naturelles :**

Les Parabènes sont généralement synthétiques, ils existent également à l'état naturel dans certains aliments tels que:

Le « Cloudberry »: petit fruit issu de la ronce des tourbières (*Rubus chamaemorus*)



**Figure 4:** Cloudberry, fruit de la plante *Rubus chamaemorus*.

- le jus de fruits de la passion,
- les vins blancs et vins liquoreux,
- la vanille Bourbon provenant de l'île de la Réunion, de Madagascar, des Comores ou de l'île Maurice (Figure 5),



**Figure 5 :** Vanille Bourbon.

- les parties aériennes d'une plante : *Stocksia brahuica* qui appartient à la famille des *Sapindacées* (15)

En 1979, on trouve du méthyparabène dans les sécrétions vaginales de chiennes en phase d'œstrus uniquement. Cela fait supposer que le méthyparabène constitue une hormone sexuelle de type phéromone chez la chienne (16).

### 1.5.2. Les sources artificielles :

La synthèse industrielle des Parabènes résulte de l'estérification de l'acide *p*-hydroxybenzoïque par un alcool. Ils sont ensuite incorporés dans des produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (16).

Dans le domaine alimentaire, on en retrouve notamment dans les plats cuisinés, les gâteaux, les huiles et les substituts du sucre ainsi que dans les emballages des aliments.

## 6. Mode d'obtention :

### 1.6.1. Synthèse industrielle :

Les Parabènes sont préparés à partir de l'acide parahydroxybenzoïque et d'un alcool correspondant à la chaîne alkyle souhaitée.

Le procédé industriel utilise le phénol comme précurseur de l'acide selon la réaction de Kolbe-Schmitt. Cette réaction consiste à la carboxylation à chaud et sous pression du phénol en présence d'un sel métallique et du dioxyde de carbone selon la figure 2 ci-dessous

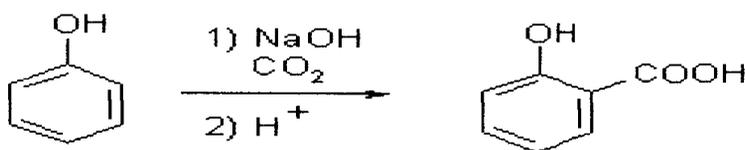
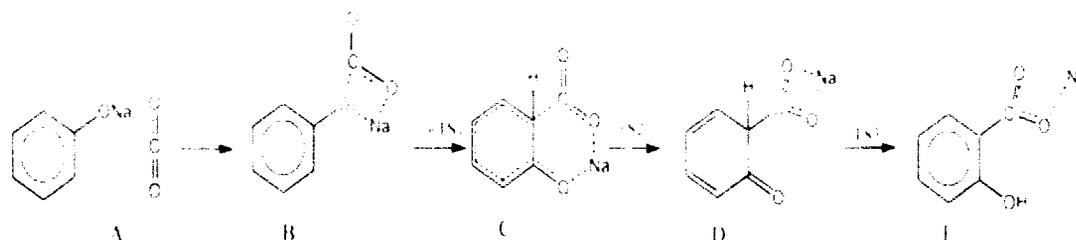


Figure 6: Réaction de Kolbe-Schmitt (17).

Le mélange réactionnel est chauffé pendant quatre heures à la température indiquée. La période de réchauffement est environ 15 heures. L'acide parahydroxybenzoïque est ensuite engagé dans une réaction d'estérification. L'acide sulfurique est employé comme catalyseur. En variant l'alcool utilisé on peut ainsi obtenir toute la famille des parabènes

Le mécanisme probable de la réaction est mis en évidence par les travaux de Markovic et Engelbrechtsz (18).



**Figure 7:** Mécanisme de la réaction de Kolbe-Schmitt.

Les produits A, B, C, D et E sont les intermédiaires réactionnels. o-TS1, TS2 et TS3 sont les états de transitions.

D'après ce mécanisme, il se forme tout d'abord un composé ortho entre le phénol, le sel et le dioxyde de carbone. Puis la formation du composé para passe par un intermédiaire réactionnel moins stable nécessitant une énergie d'activation plus élevée que dans le cas de la formation du composé ortho.

Il en résulterait une déformation du cycle permettant la formation d'un chélate orientant la réaction en para. Malgré tout, il est possible d'orienter l'addition en ortho ou en para en fonction du sel utilisé (17).

En effet, LINDSEY, JESKEY et al. ont mis en évidence l'influence du sel métallique utilisé dans la régi sélectivité de la réaction (19). Cette étude a révélé que l'addition se fait préférentiellement en para avec le sel de potassium. Ceci justifie son utilisation en synthèse industrielle.

**Tableau 2:** Pourcentage d'acide parahydroxybenzoïque en fonction du sel d'après Lindsey et Jeskey et al (19).

	Pourcentage en Acide Parahydroxybenzoïque en fonction du sel	
	Sel de potassium (KOH)	Sel de sodium (NaOH)
1 0 0	54	4
1 5 0	44	2
2 0 0	16	2
2 5 0	1	1

L'étude montre l'influence de la température et du sel utilisée sur les proportions finales d'acide parahydroxybenzoïque. L'augmentation de la température entraîne une diminution des proportions d'acide parahydroxybenzoïque. L'utilisation du sel de potassium lors de la synthèse augmente le rendement d'acide parahydroxybenzoïque alors que l'utilisation du sel de sodium entraîne une diminution du rendement de ce dernier. A 250°C les proportions d'acide parahydroxybenzoïque obtenues sont très faibles et ne varient pas en fonction du sel

### 1.6.2. Biosynthèse :

Les Parabènes sont synthétisés à l'état naturel par certaines plantes et bactéries. L'étude de ZAHIDT T. M. et al. montre la présence du méthylparabène et du propylparabène chez *Stocksia brachuica* (20).

La présence du méthylparabène est révélée dans les graines de pamplemousse, du murier, de la passiflore, du myrtrier, de la vanille et dans les plantes d'Oca (*Oxalis tuberosa*).

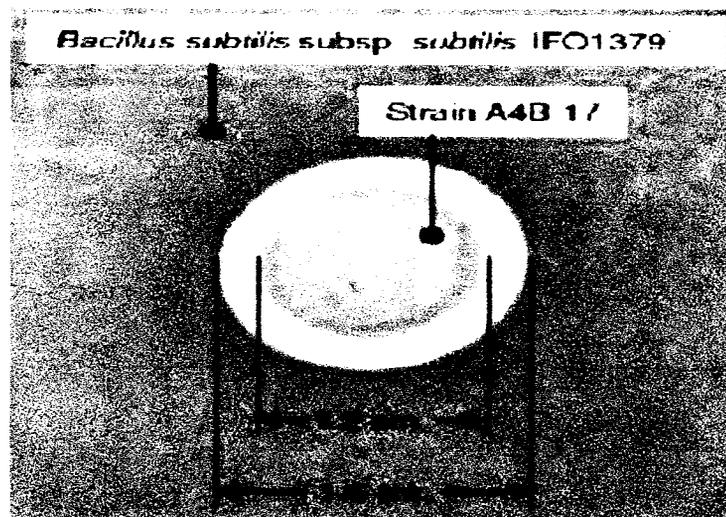
L'étude de BAIS et *al.* menée sur des plantes d'Oca à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes*, révèle la présence du méthylparabène. Ce dernier est retrouvé dans les racines et plus particulièrement dans leurs exsudats avec une concentration plus élevée dans la terre de culture. Aucune activité antimicrobienne n'a été révélée pour le méthylparabène mais, une activité antifongique a été observée à partir d'une concentration de 40µg/ml (21).

Selon PENG et *al.* les Parabènes peuvent être produits par certaines bactéries marines notamment la souche A4-B17 pour laquelle la production est la plus importante (22).

La biosynthèse de l'acide parahydroxybenzoïque en tant que métabolite secondaire peut passer par deux voies distinctes :

- ✓ la première passe par la transformation du chorismate par l'intermédiaire de la chorismate lyase aboutissant à l'acide parahydroxybenzoïque;
- ✓ la seconde transforme les cinnamates en benzoates grâce à la coenzyme-A pour donner l'acide parahydroxybenzoïque.

La spécificité de la souche A4-B17 résiderait dans l'utilisation d'une enzyme de type estérase pour la production de Parabènes.



**Figure 8:** Zone d'inhibition de la souche A4B-17 contre *Bacillus subtilis* (22).

La figure 4 montre que les bactéries produisent des Parabènes et les utilisent pour se défendre vis-à-vis des autres micro-organismes. En effet, cette figure montre qu'il n'y a pas de développement de *Bacillus subtilis* dans un rayon de 0,4cm autour d'A4B-17.

## **1.7. Réglementation et exposition :**

### **1.7.1. Réglementation:**

#### **1.7.1.1. Dans le domaine alimentaire:**

En Europe, la Directive 95/2/CE du Parlement Européen concerne les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants (Annexe III). Elle autorise l'utilisation des méthyl-, éthyl-, propylparabène et de leurs sels de sodium en tant qu'additifs alimentaires dans quatre catégories de produits industriels à une concentration inférieure à 0,1% en poids de l'aliment et de la manière suivante (23):

- en « quantum satis » dans les produits à base de viande séchée, c'est-à-dire en quantité nécessaire à l'obtention de l'effet technologique désiré en travaillant selon les Bonnes Pratiques de Fabrication.
- la dose maximale acceptable est de 1 g/kg dans les gelées recouvrant le pâté.
- la dose maximale acceptable est de 0,3 g/kg dans les confiseries (sauf le chocolat).
- la concentration maximale est de 2 g/kg dans les compléments alimentaires diététiques liquides.

Aux Etats-Unis, la FDA (Food and Drug Administration) qualifie l'adjonction des méthyl- et propylparabène aux aliments (à des concentrations ne dépassant pas 0,1%) comme GRAS (Generally Recognized As Safe) (16).

De ce fait, elle autorise leur usage en tant que :

- substances savoureuses et adjuvantes en addition directe aux boissons et en quantité n'excédant pas 20 ppm.
- substances antifongiques alimentaires indirectes, c'est-à-dire ajoutées dans les matériaux de conditionnement, sans limite de concentration.

La JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) est un comité international d'experts issus de la FAO (Food and Agriculture Organisation) et de l'OMS, statuant sur les additifs alimentaires. La FEMA (Flavour and Extract Manufacturer's Association) correspond à une association américaine regroupant les fabricants d'arômes et

d'extraits. Ces deux organismes approuvent aussi l'emploi des Parabènes dans le domaine alimentaire : en 1974, la JECFA fixe l'apport journalier conseillé (AJC) entre 0 et 10 mg/kg/j. Cependant, la Commission Européenne a demandé à des experts de l'EFSA (Européan Food Safety Authority) de réévaluer les AJC. En 2004, l'EFSA confirme les AJC à 0-10 mg/kg/j pour les méthyl- et éthylparabène ainsi que pour leurs sels de sodium mais pas pour le propylparabène. Cette réserve est due aux interrogations suscitées par certaines études, faisant état d'un éventuel effet du propylparabène sur la production de sperme chez le rat. Bien que la quantité de propylparabène soit limitée dans les aliments et qu'elle ne représente probablement aucun risque pour les consommateurs, les experts ont été incapables de recommander un AJC spécifique au regard des connaissances actuelles. Ceci nous ramène à la décision prise en 1994 par le SCF (Scientific Committee for Food) qui autorise temporairement un AJC de 0-10 mg/kg/j pour le propylparabène et son sel sodique.

Leur utilisation est autorisée dans d'autres pays tels que le Japon, le Canada ou encore les Philippines (24)

Leur utilisation est autorisée dans d'autres pays tels que le Japon, le Canada ou encore les Philippines (16).

#### 1.7.1.2. Dans les cosmétiques :

L'annexe VI, référence 12 de la Directive Européenne 76/768/CEE modifiée fixe les concentrations maximales de Parabènes pouvant être utilisés dans le produit fini (24):

- Une concentration maximale de 0,4% (équivalent en acide *p*-hydroxybenzoïque) pour un ester utilisé seul.
- Une concentration maximale de 0,8% (équivalent en acide *p*-hydroxybenzoïque) pour un mélange d'esters.

Les Parabènes peuvent être utilisés dans les cosmétiques « hypoallergéniques » à une concentration usuelle ne dépassant pas 0,3% (souvent 0,2% de méthyl- et 0,1% de propylparabène) (22).

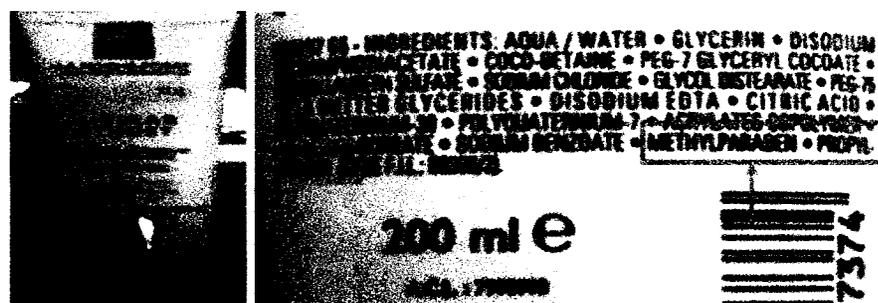


Figure 9 : photographie montre la présence de méthyle parabène dans de Lipikar Syndet.

### 1.7.1.2. Dans les médicaments:

Les Parabènes sont classés comme « **excipients à effet notoire** » car ils comportent un risque allergisant. Pour autant, le rapport bénéfice / risque des **médicaments** n'est actuellement pas remis en cause. Lors de la demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour un nouveau médicament, les industries pharmaceutiques doivent justifier scientifiquement la présence et la quantité de conservateurs utilisés. Les Autorités Européennes incitent les industriels à utiliser des méthodes physiques de conservation plutôt que des conservateurs chimiques. Cependant, la substitution n'est pas toujours possible en raison des caractéristiques physico-chimiques des principes actifs et excipients (25).

En Algérie, à défaut de réglementation locale, les autorités sanitaires ainsi que certains laboratoires pharmaceutiques fabricants s'appuient sur le répertoire de l'ANSM.

En effet la réglementation algérienne n'évoque pas les excipients à effet notoire. Une définition de ces derniers est retrouvée dans le code de santé publique français (Article R5121- 1°8) : un excipient à effet notoire (EEN) est défini comme tout excipient dont la présence peut nécessiter des précautions d'emploi pour certaines catégories particulières de patients (26).

Si un effet indésirable a été répertorié, l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire et des Produits de Santé), devenue aujourd'hui ANSM (Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des Produits de Santé) mentionnera des précautions d'emploi quant à l'usage de ce médicament. (E)

Les Parabènes sont autorisés comme conservateurs dans le domaine pharmaceutique en Europe. Conformément au document de la Commission Européenne « *Guideline on*

*excipients in the label and package leaflet of medicinal products for human use* » (CPMP/463/00Rev.1), leur présence dans les médicaments doit être indiquée du fait de leur potentiel allergène (EMA, 2013). (F)

D'après le guide de l'ANSM, les mentions concernant les excipients à effets notoires doivent être systématiquement notées dans les rubriques annexes suivantes relatives aux produits pharmaceutiques:

➤ **Résumé des caractéristiques du produit (RCP):**

▪ **Composition qualitative et quantitative :**

<Excipients> Rubrique à compléter uniquement si la dose utilisée dans le médicament en fait un EEN.

▪ **Mises en garde spéciales et précautions d'emploi :**

Mention de l'effet notoire.

➤ **Étiquetage :**

▪ **Liste des excipients :**

▪ <Liste>

Indiquer l'EEN ou la liste complète dans le cas des médicaments administrés par voie injectable, ophtalmique, ou topique, et les préparations pour inhalation.

Consulter la notice pour toute information complémentaire.

➤ **Notice :**

Liste des excipients à effet notoire.

Informations importantes concernant certains composants de XXX :<à remplir>.

▪ **Quelles sont les informations à connaître avant <de prendre> <d'utiliser> xxx ?**

Précautions d'emploi ; mises en garde spéciales.

Les Figures 10 et 11 illustrent la présence des Parabènes dans les spécialités pharmaceutiques.



### 1.7.2. Estimation de l'exposition quotidienne :

En 1984, Elder a cherché à quantifier le niveau d'exposition aux Parabènes en tenant compte des trois sources d'exposition : l'alimentation, l'utilisation de produits cosmétiques et la prise de médicaments.

On estime que l'apport alimentaire représente environ 1 mg/j, la consommation médicamenteuse environ 25 mg/j et l'application de produits cosmétiques environ 50 mg/j. Ce qui fait un apport quotidien global de 76 mg/j en Parabènes pour un individu pesant 60 kg, ce qui dépasse les 10 mg/kg/j autorisés (22).

### 1.8. Noms commerciaux des Parabènes :

Les Parabènes sont généralement commercialisés selon leur nom chimique. Nous avons cependant répertorié dans le Tableau quelques noms commerciaux qui s'en distinguent.

**Tableau 3:** quelques noms commerciaux associés aux différents Parabènes étudiés.

Substances chimiques	Code (ester/sel)	Synonymes
Methyl-Parabène	E218/E219	POB Methyl, Methyl parasept ; Methylben ; Nipagin M ; Preserval ; Septos ; Solbrol M ; Tegosept M
Ethyl-Parabène	E214 /E215	POB Ethyl, Nipagin A ; Ethyl Parasept; Solbrol A, Mycocten
Propyl-Parabène	E216/E217	POB Propyl, Propyl chemsept; Protaben P; Pulvis conservans; Solbrol P; Tegosept P; Aseptiform P; Betacide P; Chemacide PK; Nipagin P; Nipasol P; Propyl butex; Propyl Chemosept

Butyl-Parabène	–	POB Butyl FR, Aseptofom butyl; Butoben; Butyl butex; Butyl Chemosept; Butyl tegosept; Nipabutyl; Preserval B; Solbrol B;  SPF; Tegosept
Mélange de Parabènes	–	PROTACIDE NEO

## 1.9. Les principaux Parabènes utilisés :

### 1.9.1. Méthyl- Parabène :

#### ❖ Définition:

Le méthyl-parabène, également le méthyl-parabène, l'un des Parabènes, est un conservateur de formule chimique  $\text{CH}_3 (\text{C}_6\text{H}_4 (\text{OH}) \text{COO})$ . C'est l'ester méthylique de l'acide p-hydroxybenzoïque (33).

#### ❖ Occurrences naturelles :

Le méthylparabène sert de phéromone pour une variété d'insectes et est un composant de la phéromone mandibulaire reine.

C'est une phéromone chez les loups produite pendant l'œstrus associée au comportement des loups mâles alpha empêchant les autres mâles de monter les femelles en chaleur (34).

#### ❖ Usages :

Le méthylparabène est un agent antifongique souvent utilisé dans une variété de cosmétiques et de produits de soins personnels. Il est également utilisé comme conservateur alimentaire et porte le numéro E E218.

Le méthylparabène est couramment utilisé comme fongicide dans les milieux alimentaires de la drosophile. Pour la drosophile, le méthylparabène est toxique à des concentrations plus élevées, a un effet œstrogénique (imitant l'œstrogène chez le rat et ayant une activité anti-

androgène) et ralentit le taux de croissance aux stades larvaire et nymphal à des concentrations plus faibles (35).

### 1.9.2. Ethyl-Parabène :

#### ❖ Définition :

L'éthyl-parabène est un ester éthylique résultant de la condensation formelle du groupe carboxyle de l'acide 4-hydroxybenzoïque avec l'éthanol. Il a un rôle de conservateur alimentaire antimicrobien, d'agent antifongique, de métabolite végétal et de phytoestrogène. C'est un Parabène et un ester éthylique.

#### ❖ Usage :

L'éthyl- parabène est largement utilisé comme conservateur dans les cosmétiques, les produits alimentaires et **les préparations pharmaceutiques**, et est soit utilisé seul à cette fin, soit en combinaison avec d'autres esters de Parabènes ou d'autres antimicrobiens. .

Les dérivés de Parabène sont efficaces dans une large gamme de PH et possèdent un large spectre contre les germes, mais ils sont de plus en plus efficaces dans les levures et les moisissures. En raison de la faible dégradation de ces composés, leurs sels, en particulier le sel de sodium, sont utilisés à la place.

Cependant, ces sels peuvent élever le pH des formes faiblement blindées et les rendre plus alcalins (38).

### 1.9.3. Propyl -Parabène :

#### ❖ Définition et présence naturelle :

Le propyl-parabène, l'ester n-propylique de l'acide p-hydroxybenzoïque, est une substance naturelle présente dans de nombreuses plantes et certains insectes, bien qu'il soit fabriqué synthétiquement pour être utilisé dans les cosmétiques, **les produits pharmaceutiques** et les aliments. C'est un membre de la classe des Parabènes. C'est un conservateur que l'on trouve généralement dans de nombreux cosmétiques à base d'eau, tels que les crèmes, **les lotions**, les

shampoings et les produits pour le bain. En tant qu'additif alimentaire, il porte le numéro E E216 (36).

❖ **Usage :**

le p-hydroxybenzoate de propyle sodique, le sel de sodium du propylparabène, un composé de formule  $\text{Na (C}_3\text{H}_7 \text{ (C}_6\text{H}_4\text{COO) O)}$ , est également utilisé de la même manière comme additif alimentaire et comme agent de conservation antifongique. Son numéro E est E217.

En 2010, le comité scientifique de l'Union européenne pour la sécurité des consommateurs a déclaré qu'il considérait l'utilisation du butylparabène et du propylparabène comme conservateurs dans les produits cosmétiques finis comme sûre pour le consommateur, tant que la somme de leurs concentrations individuelles ne dépassait pas 0,19% (37).

#### **1.9.4. Butyl Parabène :**

❖ **Définition:**

Le butyl-parabène, ou p-hydroxybenzoate de butyle, est un composé organique de formule  $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_2\text{CC}_6\text{H}_4\text{OH}$ . Il s'agit d'un solide blanc soluble dans les solvants organiques. Il s'est avéré être un conservateur antimicrobien très efficace en cosmétique. Il est également utilisé dans les suspensions de médicaments et comme additif aromatisant dans les aliments (27).

❖ **Présence naturelle :**

Des membres de la famille des Parabènes se trouvent dans les fruits et légumes, comme l'orge, les graines de lin et les raisins. Il a également été constaté que le butyl-parabène était produit dans certains micro-organismes, notamment le microbulbifer (28).

❖ **Usages et réactions :**

Le butyl-Parabène est l'un des additifs bactéricides / fongicides les plus courants dans les cosmétiques. Il est utilisé dans les produits cosmétiques depuis les années 40 et dans les produits pharmaceutiques depuis 1924 (29). La popularité du butylparabène dans ces produits est due à sa faible toxicité chez l'homme et à ses propriétés antimicrobiennes efficaces, en particulier contre les moisissures et les levures. On le trouve maintenant dans plus de 20 000 produits cosmétiques, y compris les ombres à paupières, les hydratants / traitements pour le visage, les crèmes anti-âge, les fonds de teint et les écrans solaires. Il est également utilisé comme solutions à faible force ionique comme conservateur dans certains aliments et

médicaments (30,31). Dans la plupart des cosmétiques, le Parabène est utilisé à de faibles niveaux, allant de 0,01 à 0,3%. Le butylparabène est utilisé à de faibles concentrations dans des suspensions de médicaments liquides et solides, comme le tylenol (acétaminophène) et l'ibuprofène (32).

Chapitre 2: les  
Parabènes dans les  
préparations liquides  
non stériles

## 2. Les Parabènes dans les préparations liquides non stériles:

### 2.1. Rôle des Parabènes dans la stabilité microbienne des médicaments:

Les parabènes ont été utilisés pour la première fois dans les médicaments en 1924. (39) Depuis, ils ont été incorporés comme agents de conservation (antimicrobien) dans une grande variété de formulation médicamenteuse. On les retrouve presque dans toutes les préparations pharmaceutiques mais surtout dans les préparations liquides non stériles en raison de leur forte proportion en eau, son plus susceptible de subir une contamination microbienne. On fait alors appel aux Parabènes

Du fait du nombre important de spécialités contenant des parabènes et inscrites au Vidal électronique (531 spécialités), le Tableau 4 dresse une liste non exhaustive en citant, pour chaque forme galénique, au moins deux noms de spécialités.

**Tableau 4 :** Quelques exemples de spécialités contenant des parabènes classés selon la voie et la forme d'administration.

Voie d'administration	Forme galénique	Nom de spécialité
Voie orale	Solutions buvables	Biocalyptol <sup>®</sup> , Flagyl <sup>®</sup> , Hélicidine <sup>®</sup>
	Collutoires et pulvérisations nasales	Actisoufre <sup>®</sup> , Hexaspray <sup>®</sup>
	Dentifrices et pâtes gingivales	Elgydium <sup>®</sup> , Fluocaril <sup>®</sup> , Arthrodont <sup>®</sup>
	Comprimés	Dragées Fuca <sup>®</sup> , Polaramine Repetabs <sup>®</sup>
	Poudres (sachets)	Gaviscon <sup>®</sup> , Moxydar <sup>®</sup>
Voie ophtalmique	Collyres	Optrex <sup>®</sup> , Sensivision <sup>®</sup>
Voie parentérale	Solutions injectables	Depoprovera <sup>®</sup> , Farlutal <sup>®</sup>
Voie cutanée	Pommades et crèmes	Biafine <sup>®</sup> , Dexeryl <sup>®</sup> , Locoid <sup>®</sup>
	Emplâtres	Bétésil <sup>®</sup> , Flector tissugel <sup>®</sup>
	Shampoings antipoux	Charlieu antipoux <sup>®</sup> , Itax <sup>®</sup>
Voie vaginale	Capsules, ovules	Colpotrophine <sup>®</sup> , Lomexin <sup>®</sup>
Voie rectale	Lavement, mousse	Normacol <sup>®</sup> , Colofoam <sup>®</sup>

Les parabènes les plus utilisés en pharmacie sont les **méthyl-** et **propylparabènes**.

Il n'existe qu'une spécialité dans laquelle le parahydroxybenzoate de benzyle joue le rôle d'actif : il s'agit du Nisazol<sup>®</sup>, antiseptique local utilisé pour la désinfection des petites plaies et des brûlures superficielles peu étendues.

### 2.1.1. Mécanisme d'action:

Les parabènes agissent sur les deux phases, germinative et végétative, du développement des microorganismes. La phase de germination est beaucoup plus sensible aux Parabènes que la croissance végétative des champignons ou bactéries.

Les parabènes présentent de multiples actions biologiques, mais il est généralement admis que leurs effets sur le transport à travers la membrane cellulaire et la paroi cellulosique, et sur le fonctionnement des mitochondries, sont la clé de leur action. (40)

Le mode d'action présumé des parabènes serait lié à la fixation de ces derniers à la surface de la membrane cytoplasmique des bactéries, ce qui provoquerait une altération et une destruction de cette membrane. Il en résulterait une fuite extra-cellulaire des électrolytes et des constituants vitaux de la bactérie, qui se viderait littéralement de son contenu. (41)

Au niveau du cytoplasme, les parabènes agissent en provoquant une perturbation de la respiration cellulaire (effet inhibiteur sur la consommation d'oxygène), du transport des électrons et des systèmes enzymatiques d'oxydation.

Une étude australienne (2005) examinant les effets de l'éthylparabène et le propylparabène sur l'ouverture des canaux mécano-sensitifs de la bactérie *Escherichia coli*, montre que les parabènes interagissent également avec les canaux sensitifs, en forçant leur ouverture, désorganisant ainsi le gradient osmotique dans la bactérie. (42)

Une autre étude de 2005 de la faculté de médecine de Marseille confirme ces résultats en démontrant que le propylparabène induit une libération du potassium ( $K^+$ ) cytoplasmique de la bactérie (*E. coli*), de façon tout à fait comparable à l'action de la polymyxine B, antibiotique bien connu. (43)

Dans une étude datant de 1951 portant sur 186 patients sujets à des candidoses à *Candida albicans*, les résultats observés suggèrent que les parabènes peuvent se montrer utiles dans le contrôle du développement de levures comme *Candida albicans*, durant un traitement antibiotique. Ainsi, une administration de méthylparabène et propylparabène par voies orale,

vaginale ou rectale, diminue le risque de développement d'une candidose lors d'un traitement antibiotique par l'auroéomycine. Chez trois patientes présentant des candidoses vaginales, l'application journalière intra-vaginale de 200 mg de parabène améliore les symptômes. (44)

Les parabènes sont efficaces à **faibles concentrations** contre les champignons et les bactéries. Ces composés sont plus actifs contre les champignons que les bactéries et sont plus actifs contre les bactéries **gram+** que les bactéries **gram-** (**tableau 5**). Ces composés ont un **effet statique** plus que létal sur les microorganismes. Les combinaisons de parabènes sont plus actives que les Esters utiliser seul (**effet additif**). Les parabènes sont efficaces dans les solutions acides, neutres ou légèrement alcalines. Au-delà de PH 8, l'hydrolyse peut se produire et réduire l'efficacité des agents de conservation. (45,46) Leur activité croît en même temps que la longueur de la chaîne mais s'accompagne d'une diminution de solubilité en phase aqueuse. Or, la réplication microbienne survient en phase aqueuse ; c'est donc la quantité de parabène dissoute en phase aqueuse qui détermine la capacité conservatrice de celui-ci. Par conséquent, les parabènes à chaîne courte (méthyl- et éthyl-) constituent des conservateurs antimicrobiens de choix. (22)

**Tableau 5:** concentration efficace des parabènes. (47,48,49,50,51)

Micro-organisme	Espèces	Concentration efficace (% par poids de produit)			
		Méthyl-parabène	Ethyl-parabène	Propyl-parabène	Butyl-parabène
Champignon	<i>Rhizopus nigricans</i>	0.05	0.025-0.05	0.0125	0.0063
	<i>Trichoderma lignorum</i>	0.025	0.0125	0.0125	0.0063
	<i>Chaetomium globosum</i>	0.05	0.025	0.0063	0.0031
	<i>Candida albicans</i>	0.1	0.1	0.0125-0.1	0.0125-0.1
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.1-0.23	0.05-0.1	0.01-0.0125	0.0063
	<i>S. pastorianus</i>	0.1	0.05	0.0125	0.0063
	<i>Aspergillus flavus</i>	0.04-0.0125	0.03	0.08	0.02
	<i>A. niger</i>	0.08-0.27	0.04-0.06	0.02-0.07	0.02
	<i>Penicillium digitatum</i>	0.05	0.025	0.0063	0.0031
	<i>P. crysoqenum</i>	0.01	-	-	-
	<i>P. glaucum</i>	0.04-0.1	0.03-0.15	0.15	0.02-0.15
	<i>P. expansum</i>	-	-	-	0.02
	<i>Mucor mucedo</i>	0.04-0.15	0.03-0.04	0.05-0.1	0.02
	<i>Torula sp.</i>	0.125-0.15	0.025-0.1	0.05-0.1	-
	<i>Epidermophyton floccosum</i>	0.025-0.1	-	0.01	0.01
	<i>Microsporium audovini</i>	0.01-0.1	-	0.01	0.01
	<i>Trichophyton ferrugineum</i>	0.025-0.1	-	0.01	0.01
	<i>T. mentagrophytes</i>	+0.008	0.008	0.004	0.002
	<i>Hormodendrum compactum</i>	0.025-0.1	-	0.01	0.01
	<i>Phialophora verrucosa</i>	0.025-0.1	-	0.1	0.1
<i>Ceotrichum sp.</i>	0.05	-	-	-	
<i>Monosporum apiospermum</i>	0.1	-	0.1	0.01	
<i>Sporotrichum schenckii</i>	0.05-0.1	-	0.01	0.01	

	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	0.01-0.1	-	0.01-0.1	0.01
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.05-0.1	-	0.01	0.01
bactéries	<i>Haplosporangium parvum</i>	0.025	-	-	-
	<i>Histoplasma capsulatum</i>	0.1-0.025	-	0.01	0.01
	<i>Trichosporon beigeli</i>	0.1	-	0.01	0.01
	<i>Piedraia hortai</i>	0.1	-	0.01	0.01
	<i>Other fungi</i>	-	0.1-0.025	-	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	0.12-0.25	0.1-0.2	0.025-0.2	0.0125
	<i>B. cereus</i>	0.2	0.1	0.125	0.0063
	<i>B. coli</i>	0.125-0.15	-	0.05-0.1	0.02
	<i>B. coagulans</i>	0.15-0.35	-	0.05-0.07	-
	<i>B. megaterium</i>	0.14	0.06	0.03	0.01
	<i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>Micrococcus pyogenes aureus</i> )	0.16-0.4	0.065-0.15	0.04-0.15	0.0125-0.02
	<i>S. pyogenes</i>	0.063	0.063	0.05	-
	<i>Sarcina futea</i>	0.25-0.4	0.1-0.25	0.05-0.25	0.0125
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.1	0.05	0.025	0.0125
	<i>Escherichia coli</i>	0.125-0.4	0.1-0.125	0.05-0.1	0.4
	<i>Salmonella typhosa</i>	0.2	0.1	0.1	0.1
	<i>S. schottmulleri</i>	0.2	0.1	0.05	0.1
	<i>S. typhimurium</i>	-	-	0.020-0.025	-
	<i>Proteus vulgaris</i>	0.2	0.1-0.15	0.05-0.15	0.05
	<i>Aerobacter aerogenes</i>	0.125-0.24	0.1	0.05-0.1	0.4
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.1-0.4	0.2-0.4	0.2-0.8	0.8
	<i>P. fluorescens</i>	0.15-0.4	0.2	0.05-0.2	0.4
	<i>Streptococcus hemolyticus</i>	0.01	-	0.1	0.1
	<i>S. faecalis</i>	-	0.130	0.04	0.012
	<i>Serratia marcescens</i>	0.080	0.049	0.04	0.019
	<i>Achromobacter sp.</i>	0.23-0.24	-	0.05-0.07	-
	<i>Arthrobacter simplex</i>	0.36-0.38	-	0.07-0.09	-
<i>Clostridium botulinum</i>	0.1-0.12	0.04	0.04	0.02	
<i>Corynebacterium acnes</i> (5 strains)	-	-	1.0	-	
<i>Nocardia asteroides</i>	0.025-0.1	-	0.1	0.01	

### 2.1.2. Les concentration utilisées :

En France les parabènes figurent sur la liste des Excipients à Effet Notoire (EEN) parue en Annexe II de la décision du 28 juillet 1999 dans le Journal Officiel du 29 août 1999. Ceci concerne la voie topique et la voie parentérale où il n'y a pas de dose seuil établie. Les concentrations varient d'un produit à l'autre mais dépassent rarement 1%. (16) Les doses généralement utilisées sont en fonction de la forme galénique :

- 0,05 à 0,15% : voie orale et vaccins.
- 0,05 à 0,1% : gouttes ophtalmiques (en association avec le benzalkonium)
- 0,1 à 0,15% : crèmes, gels, lotions

L'ajout de conservateur devra être précisé sur l'étiquette du médicament avec la teneur par unité de masse ou de volume.

### 2.1.3. Utilisation en association :

Pour évaluer l'efficacité d'un conservateur, on peut considérer deux facteurs :

- L'activité intrinsèque de la substance, souvent liée à la lipophilie de la molécule permet de plus ou moins bien traverser la paroi cellulaire et la membrane plasmique du micro-organisme.
- La solubilité aqueuse est déterminante car la réplication microbienne a lieu généralement dans la phase aqueuse.

On a vu que l'augmentation de la chaîne alkyle induisait une augmentation de la lipophilie mais une réduction de la solubilité en milieu aqueux. En considérant ces deux propriétés, on peut agir de différentes façons :

- On procède à un mélange de parabène de chaînes alkyles de longueurs différentes, permettant d'augmenter la concentration totale en conservateur. Cette association aboutirait à des effets antimicrobiens additifs, et non synergiques. (52) L'association la plus fréquemment rencontrée est celle comportant du méthylparabène et du propylparabène.

Plusieurs associations sont commercialisées comme le Nipastat® (laboratoire Nipa), mélange de méthyl-, éthyl-, propyl-, et de butylparabène. Le Liqua par® (Mallinckrodt, Inc.) est un mélange d'isopropylparabène, d'isobutylparabène et de butylparabène.

- Pour augmenter l'efficacité des parabènes, on peut aussi ajouter des agents solubilisants ou co-solvants, comme le propylène glycol. Une étude réalisée par Darwish et Bloomfield a montré l'augmentation significative de la solubilité des méthylparabène et propylparabène avec l'ajout d'un co-solvant, la meilleure dissolution étant obtenue avec l'éthanol, solvant le moins polaire parmi ceux étudiés. (53)

Selon une autre étude de Darwish, l'augmentation d'activité des parabènes en présence de co-solvant serait liée à une synergie des effets au niveau de la membrane cellulaire des micro-organismes, l'action du co-solvant étant d'autant plus importante que sa polarité est faible.(54)

- Les parabènes sont aussi très souvent utilisés en association avec d'autres conservateurs

antimicrobiens (55) comme le phénoxyéthanol, qui améliore l'activité vis-à-vis des bactéries à Gram-, l'Imidazolidinyl Urée, ou la Diazolidinyl Urée. Le Phénonip® (laboratoire Nipa) et le Sepicide®HB (laboratoire Seppic) sont des mélanges de phénoxyéthanol, de méthylparabène, d'éthylparabène, de propylparabène et de butylparabène.

Le Germaben II® (laboratoire Sutton) est un mélange de Diazolidinyl Urée, de méthylparabène, de propylparabène et de propylène glycol. Il est efficace vis-à-vis des bactéries, levures et moisissures. Il peut être utilisé dans une large gamme de pH allant de 3 à 9. Il est soluble dans l'eau et dans la phase aqueuse des émulsions aux concentrations d'utilisation. Il est compatible avec la plupart des ingrédients utilisés en cosmétologie.

L'activité antimicrobienne des parabènes est également augmentée par synergie en présence d'EDTA (éthylènediaminotétra-acétate), qui a un effet chélateur notamment sur le fer, un élément essentiel à la croissance bactérienne. (56) L'effet des parabènes augmente aussi avec l'antioxydant BHA qui possède de bonnes propriétés antimicrobiennes contre les bactéries gram +.

## **2.2. La pharmacocinétique :**

### **2.2.1 Absorption :**

- **Voie oral**

Dans une évaluation sur les méthylparabène et propylparabène en 1972, le SCOGS (Select Committee on GRAS/Generally Recognized As Safe Substances), démontre que les parabènes, après administration par voie orale, sont rapidement absorbés au niveau gastro-intestinal, et métabolisés (études réalisées sur des rats, souris, lapins, chiens, chats et humains). (57)

- **Cutanée**

Au niveau cutané, les parabènes sont facilement absorbés à travers la peau saine, l'absorption augmentant avec la longueur de la chaîne, du fait d'une plus grande liposolubilité. (58) Celle-ci peut être influencée par la présence d'agents de pénétration introduits dans la préparation cosmétique. (59) Des études ont mis en évidence la dégradation des parabènes après application sur la peau par 4 carboxyestérases, ce qui explique une faible exposition systémique du consommateur. (60) Ceci montre l'importance du métabolisme au niveau

cutané dans la réduction du taux de parabène susceptibles d'accéder à la circulation générale. Pourtant, en 1997, une étude *in vitro* menée sur de la peau prélevée chez le rat, montre qu'une partie du propylparabène appliqué (30 %) par voie locale subit un passage transdermique sans être transformée par les enzymes cutanées (caboxyestérases) en acide para-hydroxybenzoïque. Il en va de même pour le butylparabène en moindre proportion (4%). (8)

### 2.2.2. Métabolisme :

Les parabènes, une fois dans le sang, se lient à l'albumine. La liaison augmente avec la longueur de la chaîne alkyle, elle induit une perte d'activité antifongique. (62)

Des études *in vivo* sur l'homme ont montré qu'il n'existait aucun phénomène d'accumulation dans l'organisme, même suite à une administration chronique. (63) C'est ce que confirme le rapport du SCOGS de 1972 à propos du méthylparabène et du propylparabène. (57)

La quasi-totalité de la dose de parabène administrée par voie orale est transformée en 5 à 72h en acide para-hydroxybenzoïque et ses conjugués. Cette transformation se fait par une hydrolyse par des estérases et conjugaison, par les systèmes enzymatiques hépatiques et rénaux. La demi-vie d'élimination des parabènes est d'environ douze heures (jusqu'à 86% du méthylparabène est excrété dans l'urine dans les 24 heures après l'administration) (64). Le métabolisme est rapide, des métabolites apparaissent au niveau urinaire 1/2 heure après l'ingestion des parabènes. (65)

Une étude *in vitro* de 1984 suggère que les estérases du foie et des reins sont très efficaces dans l'hydrolyse des parabènes (100% d'hydrolyse en 3 minutes). (66)

Une étude *in vivo* de 1999 réalisée par le Ministère de la Santé du Japon, à Tokyo, rapporte que les parabènes sous forme estérifiée ne peuvent être détectés ni dans le sang, ni le lait maternel. Cependant, l'acide para-hydroxybenzoïque, principal métabolite, est détecté dans tous les échantillons analysés. Les principales concentrations sont de 44 ppm dans le sang d'un adulte, 73 ppm dans le sang d'une femme enceinte, 96 ppm dans le sang du cordon ombilical, et 108 ppm dans le lait maternel. (67)

Plus récemment, plusieurs études *ex vivo* ont mis en évidence la présence de métabolites des parabènes et éventuellement des composés parents dans le liquide séminal humain.

D'après l'AFSSaPS et sur la base des données de la littérature, il apparaît que le profil pharmacocinétique des parabènes est mal caractérisé, notamment en termes de distribution et d'accumulation. (68) Elle préconise la conduite d'une étude permettant de caractériser le devenir des parabènes dans l'organisme (évaluation de la distribution, de l'accumulation

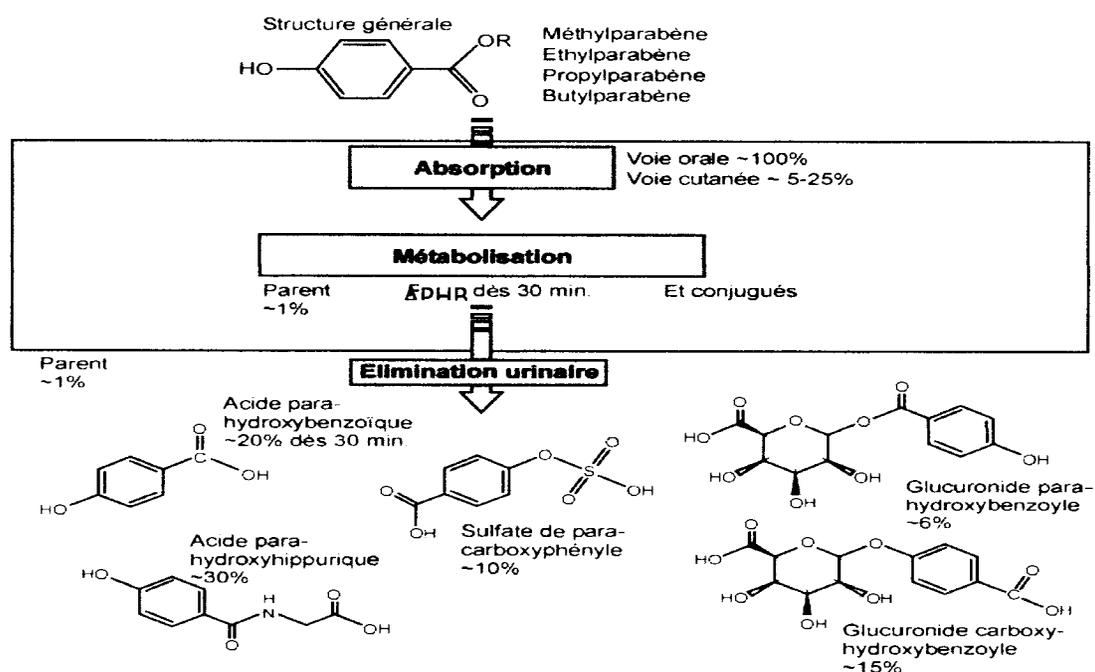
potentielle, de l'élimination). (69)

### 2.2.3. Excrétion :

L'excrétion des parabènes se fait principalement par voie urinaire, les principaux métabolites excrétés sont, par ordre décroissant, l'acide para-hydroxybenzoïque, l'acide para-hydroxyhippurique (l'acide para-hydroxybenzoïque conjugué avec la glycine), le glucuronide carboxy-hydroxybenzoyle et le glucuronide *para*-hydroxybenzoïque (l'acide para-hydroxybenzoïque conjugué avec le glucuronide), sulfate *para*-carboxyphényle (l'acide para-hydroxybenzoïque conjugué avec le sulfate). (57,70) L'excrétion urinaire des parabènes sous forme d'esters inchangés est très faible, habituellement moins de 1 % de la dose administrée. (71)

Dans une série d'études (1960, 1962, 1964), Tasukamoto et Terade étudient le métabolisme des méthyl-, éthyl-, propyl- et butylparabène chez le lapin. En général, 24h après l'administration de parabène par voie orale, ceux-ci sont excrétés sous différentes formes : 25 à 39% d'acide para-hydroxybenzoïque, 25 à 29% de glycine conjuguée, 5 à 8% d'ester glucuronique, 10 à 18% d'éther glucuronique et 7 à 12% d'acide sulfurique.

Plus la chaîne alkyle est longue, moins le taux d'excrétion d'acide para-hydroxybenzoïque est important (72).



**Figure 12:** Schéma de pharmacocinétique des parabènes établi d'après les tests sur l'animal (73).

### 2.3. Étude de toxicité :

#### 2.3.1 Toxicité aigue :

La toxicité aiguë des parabènes, quelle que soit la voie d'administration, est peu importante dans le cadre des expériences menées sur des animaux. Elle décroît avec l'augmentation de la chaîne alkyle, en raison d'un temps d'hydrolyse de la molécule plus important. (74)

Le rapport du SCF (Scientific Committee on Food) affirme que la toxicité aiguë des parabènes n'apparaît qu'à doses élevées. Une valeur NOAEL (no-observed-adverse-effect level, soit une dose sans effet nocif observé) de 1000 mg/kg/jour est acceptée pour tous les esters. (71)

Les doses létales des parabènes et de leurs sels entraînent chez la souris une perte rapide du contrôle musculaire (ataxie), une paralysie, une profonde dépression du système nerveux central ressemblant à une anesthésie, et une mort rapide. (74) Une administration de doses élevées mais cependant non létales entraîne les mêmes effets, cette fois-ci suivis d'un rétablissement. (71)

Les doses létales 50 (DL 50) chez l'homme par voie orale sont de :

- 8 g/kg pour les méthyl-, propyl-, éthylparabène
- 5 g/kg pour le butylparabène. (75)

On notera que la DL 50 pour le Kathon®CG est de 3 g/kg.

Des résultats d'études sur la toxicité du mélange de différents parabènes n'ont pas excédé les valeurs théoriques additives, suggérant que ces composés ne présentaient pas une toxicité synergique.

#### 2.3.2 Toxicités sub-chronique :

Les quelques études existantes concernant des tests à court terme ou sub-chroniques ont été conduites sur des rats, des souris, et des lapins. (76,77,78) Lors de ces études, aucune toxicité particulière n'a été observée, hormis une légère prise de poids à partir de plusieurs semaines d'exposition. (77) Les effets toxiques ont été observés à très hautes doses (>2% de

l'alimentation). Cette fois, des pertes de poids, (77,78) des atrophies tissulaires et nécroses hépatiques ont été recensées et aux plus hautes doses les animaux sont morts. (78)

Une étude de toxicité sub-chronique a été réalisée par Hoberman et al. (79) En 2008 durant une période de huit semaines sur des rats. Ceux-ci ont été exposés au méthylparabène et au butylparabène dans leur nourriture à des doses allant de 0 à 10000 parties par million (ppm) à partir de leur 22<sup>ème</sup> jour de vie. Les résultats n'ont pas montré de modification du poids des organes, de l'histologie des tissus d'organes reproductifs, de la production de sperme ni de la mobilité, de la morphologie et du taux d'hormones reproductives. La conclusion a été que ni le méthylparabène, ni le butylparabène ne modifiait les fonctions ou les organes reproducteurs même à des expositions par voie orale correspondant à des doses de 1,14 mg/kg de pc/j pour le méthylparabène et de 1,09 mg/kg pc/j pour le butylparabène. Cette étude a été réalisée par un consortium industriel et avait pour but de reproduire l'étude menée par Oishi et al. (80) Selon les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL).

En 2010, Barse et al. (81) ont étudié le comportement de carpes exposées à une forte dose de méthylparabène (4.2 ppm dans l'eau) durant 26 jours. Celles-ci sont devenues léthargiques à la fin de l'expérience, avec une réponse ralentie aux stimuli.

### **2.3.3 Toxicité chronique / Carcinogénicité :**

La structure chimique des parabènes n'indique pas de potentiel carcinogène, et ceci est conforté par les études menées chez les animaux. (82)

Une étude de 1971, réalisée sur 80 rats, montre que le méthylparabène, administré à des doses de 3,5 mg/kg deux fois par semaine, ceci pendant 52 semaines par voie sous-cutanée, n'est pas carcinogène. (83)

L'éthylparabène administré dans le régime alimentaire de 65 rats, à une concentration de 2% (soit 1 g/kg/jour) durant toute leur vie, ne montre aucun potentiel carcinogène. (84)

Dans une étude de 1956, 8 % de propylparabène fut incorporé au régime alimentaire de rats pendant 96 semaines. Les six organes majeurs (foie, rein, cœur, poumon, rate et pancréas) furent examinés. Aucune incidence du propylparabène ne fut établie sur l'augmentation du nombre des tumeurs. (85)

Dans une étude de carcinogénicité du butylparabène et de l'isobutylparabène, il n'apparaît pas de changement, tant sur l'incidence d'un cancer que sur l'accélération du développement d'une tumeur, chez des souris nourries avec ces parabènes à une concentration massique de 0,6%, pendant 102 semaines, par rapport à un lot témoin. (86)

#### **2.3.4. Génotoxicité :**

En 1979, une étude *in vitro* réalisée sur des cellules de poumon de hamsters, rapporte qu'en présence de biphényles polychlorés, une dose de 0,125 mg/ml de méthylparabène peut provoquer des aberrations chromosomiques. (87)

En 2004, les études recensées par l'EFSA avaient montré que les parabènes pouvaient induire des aberrations chromosomiques sur des cellules de poumon de hamster chinois. En revanche, le méthylparabène ne produisait pas d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur des cellules embryonniques humaines de poumon ni sur des cellules de moelle épinière de souris et de rats. (88)

En 2008, Tayama et al. (89) ont montré que le propylparabène et le butylparabène pouvaient causer des dommages sur l'ADN, détectables par des tests spécifiques, sous la forme d'aberrations chromosomiques. Ces effets étaient observés à de fortes doses (0,75 mm et 1 mm). Depuis, aucune étude ne s'est penchée sur la génotoxicité des parabènes.

#### **2.3.5. Tératogénicité :**

Le rapport du SCF rapporte des études sur la reproduction et la tératogénicité chez le rat avec l'éthylparabène (celui-ci représentant plus de 10% du régime alimentaire des animaux testés). Elles n'ont pas démontré d'effets secondaires sur la reproduction. En revanche, ils sont observés des anomalies fœtales, bien qu'il n'y ait pas de lien dose à effet établi. Pour cette raison, une nouvelle étude de tératogénicité chez le rat par voie orale est souhaitée. (71)

L'EFSA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) rapporte en 2004 que de récentes études sur la toxicité développementale chez des rats, souris, hamsters et lapins ayant ingéré quotidiennement du méthylparabène ont été menées, et aucune toxicité fœtale n'a été relevée, et ce pour des doses allant jusqu'à 300 mg/kg/jour pour le lapin et 550 mg/kg/jour pour le hamster (doses les plus élevées testées). (71)

En 2009, Shaw et al. (90) ont réalisé un test en deux temps chez la souris. Dans la première expérience, l'exposition au butylparabène s'est faite par voie sous-cutanée à des doses allant de 0.05 à 35 mg/animal/jour, sur des souris inséminées et entre le premier et le 4<sup>ème</sup> jour de gestation. Aucune modification de la taille de la descendance, du nombre de souriceaux ou de leur poids n'a été observée. Dans la seconde expérience, des doses de 35 et 40 mg de propylparabène ont été administrées par voie sous-cutanée chez des souris inséminées et sacrifiées au 6<sup>ème</sup> jour de gestation. Il a été observé que l'administration de propylparabène jusqu'à la dose de 40 mg n'avait pas d'impact sur le nombre de sites d'implantation utérins.

### 2.3.6. Cytotoxicité :

Les résultats de plusieurs anciennes études sont contradictoires. Les principales observations de toxicité induites par les parabènes concernent des effets de prolifération dans les cellules d'estomac de souris. (88)

En revanche, les données concernant les modifications histologiques dues aux parabènes sont assez récentes. En 2010, Barse et al. (81) a observé des modifications histologiques chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*) exposée au méthylparabène pendant 26 jours par le biais de l'eau. A haute dose d'exposition (4.2 ppm, dose la plus importante testée dans cette étude), une dégénération histologique, des vacuolisations et des nécroses ont été observées dans le foie des poissons. Des modifications des tissus testiculaires de type fibrose et atrophie de l'épithélium germinale ont également été relevées. En conséquence, une diminution du nombre de spermatozoïdes a été remarquée.

Les cellules de la lignée MCF-7 ont été souvent utilisées afin de déterminer l'effet prolifératif des parabènes. (91)

En 2012, Dagher et al. (92) se sont servis de ces cellules comme modèle de cellules épithéliales du sein cancéreuses afin d'évaluer le devenir des parabènes et ses biotransformations. Pour cela, ils ont évalué la toxicité des parabènes envers ces cellules en les mettant en contact prolongé (1, 3 et 18 heures) à différentes concentrations (2,5 à 1000 mol/L). Le méthylparabène s'est montré non toxique pour les cellules MCF-7 aussi bien après 1 heure qu'après 18 heures d'exposition et sa concentration n'a pas varié durant l'expérience montrant une absence de métabolisme. Le butylparabène et le benzylparabène en revanche ont montré une cytotoxicité à 25 mol/L au bout d'1 heure d'exposition.

En 2012 également, Khanal et al. (93) ont étudié la cytotoxicité des parabènes sur des cultures cellulaires de type HepG2 (cellules hépatiques humaines, utilisées comme modèles *in vitro* pour l'étude de l'induction enzymatique). Pour cela, les cellules ont été exposées aux différents parabènes durant 24 heures et leur viabilité a été mesurée. Les résultats ont montré que le butylparabène était le parabène le plus cytotoxique, entraînant des fragmentations de l'ADN. En revanche, l'acide para-hydroxybenzoïque n'a montré aucune toxicité envers les cellules, et ce même jusqu'à la plus forte dose de 1 mmol/L. Le méthylparabène s'est montré très légèrement toxique avec une viabilité de 90% au bout de 24 heures. Le propylparabène en revanche a entraîné une viabilité d'environ 20% seulement après le même temps d'exposition.

### 2.3.7. Activité œstrogénique des Parabènes :

Même si les parabènes sont reconnus comme des substances relativement sûres, leur effet œstrogénisant est très controversé à l'heure actuelle. Celui-ci a été étudié du fait de leur structure similaire à d'autres produits connus pour être "œstrogène-like" : les alkylphénols.

En effet, la présence d'un groupement alcool en para sur le cycle aromatique est considérée comme une condition importante pour observer un effet œstrogénique. (94)

Plusieurs études réalisées *in vitro* et *in vivo* démontrent les effets œstrogéniques des parabènes. Même si cet effet est moindre comparé à celui du 17- $\beta$  œstradiol, il n'est pas pour autant négligeable. (95,96)

Les parabènes sont capables de se lier aux récepteurs œstrogéniques  $\alpha$  et  $\beta$  : cette liaison entraîne une activation génique responsable de la stimulation de la croissance cellulaire et de l'augmentation de la sensibilité aux récepteurs. Cette liaison se vérifie par l'utilisation de tamoxifène : c'est un anti-œstrogène indiqué dans le traitement du cancer mammaire hormono-dépendant et qui agit en déplaçant l'œstradiol de sa liaison au récepteur. On a constaté que le tamoxifène inhibe *in vitro* l'activité des parabènes.

De nombreuses études ont évalué l'affinité des parabènes pour les récepteurs des œstrogènes à l'aide du test de prolifération des cellules issues de la lignée tumorale mammaire MCF-7 (Darbre *et al.*, (97) Pugazhendhiet *al.*,(98) Van Meeuwen *et al.*, (99)Sadler *et al.* (100)). La capacité de stimulation est 10 000 à 10 000 000 fois inférieure à celle du 17 $\beta$ -œstradiol (Okuboet *al.*, (101) Byford *et al.* (102)) et l'activité œstrogénique augmente dans l'ordre méthyl, éthyl, propyl, butyl, isopropyl et isobutyl parabènes. Le Tableau 6 quantifie l'effet de

chaque parabène par rapport à celui du 17- $\beta$  œstradiol.

Pour Terasaka *et al.*, (103) la longueur des chaînes alkyles des parabènes influe sur l'effet œstrogénique dans les cellules MCF-7. Il existe une corrélation forte entre l'expression des gènes dépendants des œstrogènes et ceux induits par le propylparabène, comparativement au méthylparabène ou à l'éthylparabène.

Dans un test d'inhibition compétitive, Blair *et al.* (104) en 2000 ont testé sept parabènes pour leur capacité à déplacer l'œstradiol tritié du récepteur aux œstrogènes isolé de l'utérus de rate ovariectomisée ; l'éthylhexylparabène se révèle le plus puissant (RBA – *relative bindingaffinity* – 0,018 %) suivi par l'heptyl (0,008%), le benzyl (0,003%), le butyl (0,0009%), le propyl (0,0006 %), l'éthyl (0,0006 %) puis le méthyl parabène (0,0004 %).

**Tableau 6:** Effet œstrogénique quantitatif des parabènes. (105)

Molécule	Effet œstrogénique
17- $\beta$ œstradiol	1
Méthylparabène et acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	$2,5 \cdot 10^{-6}$
Ethylparabène	$1,5 \cdot 10^{-5}$
Propylparabène	$3 \cdot 10^{-4}$
Butylparabène	$10^{-4}$

Une hypothèse concernant l'activité œstrogénique des parabènes a été proposée par Prusakiewicz *et al.* en 2007. (106) Les auteurs ont rapporté que les parabènes inhibent les sulfotransférases de la peau et des kératinocytes. Ces enzymes participent au métabolisme des œstrogènes et leur inhibition pourrait conduire à une augmentation du taux des œstrogènes endogènes. Dans cette étude, le butylparabène a montré la plus forte activité inhibitrice. Cela explique que l'application cutanée chronique des parabènes puisse provoquer des effets œstrogéniques.

Ce sont des résultats sensiblement identiques qui ont été observés lors d'études *in vivo* chez le rat immature ou la souris immature ; lors de ces essais utérotrophiques, seuls les butyl, isobutyl et benzyl parabènes provoquent une augmentation du poids de l'utérus, confirmant

que seuls les parabènes à chaîne longue présentent un effet œstrogénique. De leur côté, les méthyl et éthyl parabènes et l'acide p-hydroxybenzoïque n'ont aucun effet sur le poids utérin (107,108,109).

**Tableau 7:** Tableau résumant les résultats de l'activité œstrogénique des parabènes.

<b>Parabène</b>	<b>Résultats <i>in vitro</i></b>	<b>Résultats <i>in vivo</i></b>
<b>Methylparabène</b>	+ (cellules MCF-7 humaines)	+ (test vitellogénine Medaka)
	+ (double hybridation levures)	+ (test pubertaire souris)
	- (double hybridation levures)	+ (test vitellogénine Carpes)
	+ (cellules CHO-K1)	
	+ (cellules GH3 rat)	
<b>Ethylparabène</b>	+ (cellules MCF-7 humaines)	- (test pubertaire souris)
	+ (cellules HeLa humaines)	
	+ (double hybridation levures)	
	- (double hybridation levures)	
	+ (cellules CHO-K1)	
<b>Propylparabène</b>	+ (cellules MCF-7 humaines)	+ (Poisson zèbre) antagoniste
	+ (cellules HeLa humaines)	- (test pubertaire souris)
	+ (double hybridation levures)	
	+ (double hybridation levures)	
	+ (cellules CHO-K1)	
<b>Butylparabène</b>	+ (cellules MCF-7 humaines)	+ (test vitellogénine Truites)
	+ (cellules HeLa humaines)	+ (test vitellogénine Medaka)
	+ (double hybridation levures)	- (test utérotrophique souris)
	+ (double hybridation levures)	- (test pubertaire souris)
	+ (cellules CHO-K1)	
<b>Isopropylparabène</b>	+ (cellules GH3 rat)	
	+ (double hybridation levures)	+ (test vitellogénine Medaka)
<b>Isobutylparabène</b>	+ (double hybridation levures)	+ (test vitellogénine Medaka)
	+ (cellules GH3 rat)	+ (test utérotrophique souris)

	+ (cellules GH3 rat)	- (test pubertaire souris)
<b>Benzylparabène</b>	+ (double hybridation levures)	+ (test vitellogénine Medaka)
<b>Acide p-hydroxybenzoïque</b>	+ (cellules MCF-7 humaines)	

### 2.3.8. Effets sur le système reproducteur mâle :

Compte tenu de l'activité œstrogénique potentielle sur des modèles in vitro des parabènes, la question de l'effet sur le système reproducteur s'est rapidement posée. En 2005 et 2007, les travaux qui confirment la capacité des parabènes à se fixer sur les récepteurs aux œstrogènes et montrent également que ces molécules sont capables de se fixer sur les récepteurs aux androgènes et notamment ceux de la testostérone. Les parabènes sont soupçonnés d'avoir une activité antagoniste de la testostérone en inhibant l'activité transcriptionnelle testostérone dépendante. (110,111) Une étude très récente vient confirmer ces résultats et ajoute que les parabènes de type méthyl, éthyl et propyl ont également une activité agoniste des glucocorticoïdes qui n'avait jamais été démontrée précédemment. (112)

Meecker *et al.* en 2010 (113) ont étudié les taux urinaires de méthyl, propyl, butyl parabènes chez une centaine d'hommes consultants pour infertilité et ont analysé les relations avec les taux sériques d'hormones et les paramètres du sperme ainsi que les dommages de l'ADN des spermatozoïdes (essai de la comète). Les échantillons d'urine contenaient à 100% du méthyl, 92 % du propyl et 32 % du butyl parabène. Aucune relation n'était observée entre le méthyl ou le propyl et les paramètres testés. Par contre la présence du butylparabène est significativement associée ( $p=0,03$ ) aux dommages de l'ADN, avec une relation dose dépendante observée avec la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

Les études in vivo chez les rats et souris s'accordent sur l'absence d'effets sur les hormones sexuelles ou sur les organes de reproduction masculins des deux molécules à chaîne courte (méthyl et éthyl). (114,115) Pour les chaînes longues (propyl et butyl), les résultats des études réalisées in vivo restent contradictoires (116, 117,118) et il semblerait, selon certains auteurs, que le métabolisme rapide de ces molécules par les estérases, et leur pénétration percutanée moins importante comparée aux chaînes courtes, pourrait constituer une explication de leur innocuité in vivo. (114)

### 2.3.9. Implication dans le cancer de sein :

On a incriminé les contraceptifs hormonaux et le traitement substitutif hormonal de la ménopause dans l'augmentation de l'incidence d'apparition du cancer du sein. De même, les phyto-œstrogènes sont controversés. Comme les parabènes possèdent une activité œstrogénique, aussi minime soit-elle, on se demande si eux aussi sont responsables de la survenue du cancer du sein.

La polémique concernant les parabènes apparaît suite à la parution d'un article du Dr Darbre en 2004, qui détecte la présence de parabènes dans des biopsies de tissus tumoraux mammaires (119): sur 20 biopsies, 18 en contiennent et le méthylparabène constitue 60% des parabènes détectés. On retrouve les concentrations moyennes de chaque parabène dans le Tableau 8.

**Tableau 8:** Concentrations moyennes des parabènes détectés dans les tissus tumoraux mammaires.

Molécules	Concentration moyenne (en ng/g de tissu)
Méthylparabène	12,7
Propylparabène	2,6
Butylparabène	2,3
Ethylparabène	2,0
Isobutylparabène	0,9

Ces concentrations coïncident avec les concentrations nécessaires pour obtenir un effet œstrogénique *in vitro*. (120)

Les études *in vitro* sont en faveur de l'hypothèse d'un effet cancérigène des parabènes sur le tissu mammaire. En effet, ils favorisent la prolifération des cellules MCF-7 du cancer du sein. (121,122)

Après cette célèbre étude de Darbre, d'autres études ont tenté d'élucider un éventuel lien entre les parabènes et les cancers. Une récente étude menée en 2012 (123) par la même équipe mesure les concentrations de cinq parabènes différents dans des tissus de cancer du sein provenant de 40 mastectomies.

Tous ont été retrouvés, à des concentrations de 16,8 ng pour le n-propyl-, 5,8 ng pour le

nbutyl-3,4 ng pour l'éthyl- et 2,1 ng pour l'isobutyl-parabène. Ils ont analysé chaque tissu à 4 endroits différents, sur un total de 160 échantillons. Les parabènes ont été retrouvés dans 158 échantillons sur 160. Les parabènes étaient le plus concentrés dans la partie axillaire, près de l'aisselle. Ils concluent que, étant donné que les parabènes sont connus pour être des perturbateurs hormonaux et que les zones les plus concentrés en parabènes correspondent aussi aux zones où le cancer est le plus fréquent, il y a forcément un lien entre les parabènes et le cancer du sein. De plus, le fait que la zone axillaire soit la plus touchée pointe fortement vers un lien avec l'usage des déodorants corporels, quoique 7 des 40 patiente ont affirmé ne jamais en utiliser.

Harvey et Everett en 2012 (124). Ont tenté d'expliquer comment des parabènes se sont retrouvés dans une tumeur mammaire. Selon eux, leur présence ne peut s'expliquer que par une absorption cutanée, les parabènes étant rapidement métabolisés lorsqu'ils sont absorbés par voie orale. Ce constat est nécessaire mais non suffisant. En l'état actuel des connaissances, les données toxicologiques et épidémiologiques ne permettent pas d'affirmer un lien de causalité entre une utilisation au long cours de produits cosmétiques contenant des parabènes et un risque avéré de cancer du sein.

#### **2.3.10. Neurotoxicité :**

Très peu d'études ont été menées concernant la neurotoxicité des parabènes. Les quelques travaux qu'il est possible de trouver ne mettent pas en évidence une neurotoxicité due aux parabènes. (125,126)

En 2009, Kawaguchi et al. (127) ont exposé des rattes gestantes à de l'isobutylparabène sous forme de capsules sous-cutanées. La descendance a été exposée via le placenta et le lait maternel et a été testée sur son comportement émotionnel. Les résultats suggèrent que les rats mâles sont plus affectés par l'exposition précoce à l'isobutylparabène. Celui-ci entraînerait de l'anxiété à l'âge adulte et des troubles de la capacité d'apprentissage.

En 2013, Ali et al. (128) ont exposé des rattes gestantes à des doses de butylparabène de 200 mg/kg de poids corporel par voie orale et vois sous-cutanée. Les effets observés ont été des désordres du développement neuronal sur la descendance, similaires à ceux observés chez des modèles autistes de rats. Aucune étude n'a cependant pu confirmer ces résultats à ce jour.

### 2.3.11. Vieillesse cellulaire photo-induite :

Une étude menée par Nishizawa *et al.* en 2006 (129) montre que les parabènes peuvent engendrer un stress oxydatif sur la peau. Un mélange de méthyl ou éthyl-parabène, du glutathion et du dioxygène est réalisé. Il y a production de 1,4-benzoquinone. Ces travaux montrent une augmentation de la consommation de l'antioxydant glutathion mais également la synthèse de peroxyde d'hydrogène, ces deux facteurs pouvant provoquer un stress oxydatif. Des études faites au Japon montrent les effets du méthylparabène sur les kératinocytes humains lors d'une exposition aux UVB. : le méthylparabène appliqué sur la peau réagit avec les UVB donnant ainsi des sous-produits du méthylparabène causant des dégradations de l'ADN (130) et facilitant l'induction de processus nuisibles pour la peau (mortalité cellulaire, stress oxydatif). (131)

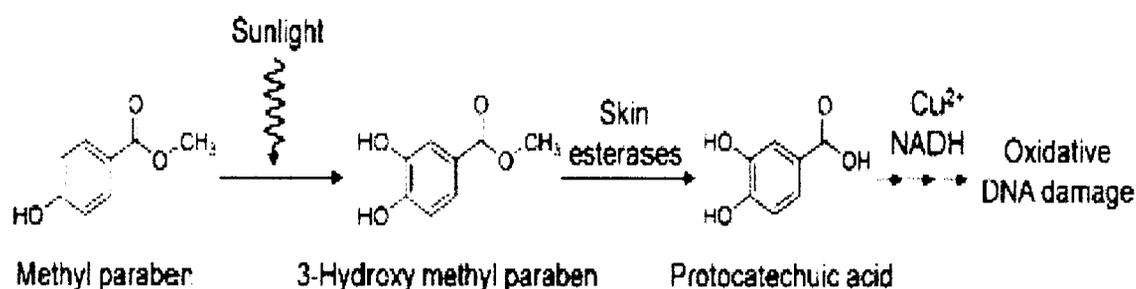


Figure 13: Réaction de dégradation de méthylparabène sous l'action de l'UVB.

Une autre étude a été menée sur des kératinocytes en 2007 (132) où une fois encore, c'est le méthyl-parabène qui a été testé. Selon l'étude, le méthyl-parabène diminue l'expression de l'ARN messager de la HAS (Hyaluronicacidsynthase) 1 et 2 et du collagène de type IV. La modification de concentration de ces composés naturels de la peau serait responsable d'un changement de conformation des kératinocytes, entraînant une incapacité pour ces cellules de proliférer. Or, la peau est en renouvellement constant. L'incapacité pour la peau de se renouveler entraîne inexorablement une irritation cutanée.

## 2.4 Avantage des Parabènes :

Les parabènes peuvent être considérés comme étant proche du conservateur idéal. En effet, ils présentent beaucoup d'avantages:

- ✓ Ils offrent un très large spectre d'activité.
- ✓ Ils ont peu d'effets secondaires.
- ✓ Ils sont bien tolérés : sur une peau normale, ils sont relativement non- irritants et non-sensibilisants (des allergies peuvent tout de même survenir : urticaire, dermatite).
- ✓ Ils présentent une très faible toxicité générale et présentent un rapport bénéfice/ risque élevé.
- ✓ Leurs propriétés organoleptiques sont favorables : inodores, insipides, incolores. De plus, ils ne provoquent pas de décoloration du produit. Ils ont un pH quasi neutre et ne causent pas de changement d'aspect du produit dans lequel ils sont incorporés. **(133)**
- ✓ Ils présentent une excellente stabilité chimique quel que soit le pH et ce dans un intervalle de 4,5 à 7,5. Ils sont par ailleurs thermostables. Ainsi, grâce à leur stabilité à haute température, les produits contenant des parabènes peuvent être stérilisés en autoclave sans perte d'efficacité antimicrobienne qui pourrait venir d'une hydrolyse. Ils sont stables également vis-à-vis de l'air, résistent à une hydrolyse dans une eau chaude ou froide et dans une solution acide. **(133)**
- ✓ Ils sont suffisamment hydrosolubles pour avoir une concentration significative en phase aqueuse. **(134)**
- ✓ Ils sont rapidement absorbés, métabolisés et excrétés sans accumulation de la molécule initiale ou de ses métabolites.
- ✓ Ils apparaissent ni photosensibilisants, ni phototoxiques. **(135,136)**
- ✓ Ils sont biodégradables. **(133)**

## 2.5. Limites des Parabènes :

Leur activité est très faible contre certaines bactéries, particulièrement du genre *Pseudomonas*. En 1976, on identifia un micro-organisme possédant l'estérase capable d'hydrolyser la liaison ester des parabènes. La souche bactérienne *Pseudomonas cepacia*, résistante aux propylparabène, utilise alors celui-ci une fois hydrolysé comme source de carbone. (137) Une autre étude datant de 2002 porte sur la bactérie *Enterobacter cloacae*, qui, mise en culture, entraîne l'hydrolyse de 500 mg/L de propylparabène en phénol en 2 heures. (138)

La performance des parabènes est également affectée par un certain nombre de facteurs environnementaux:

- ✓ une charge pulvérulente à granulométrie très fine. (139)
- ✓ le pH du produit fini : L'efficacité est modérée à un pH supérieur à 7, ce phénomène est dû à l'hydrolyse. A pH 8 par exemple, une solution de méthylparabène s'hydrolyse dans une proportion de 10% en 137 jours et ce à 25°C. (140) Plus la longueur de la chaîne alkyle est importante, plus la résistance à l'hydrolyse augmente. (133)
- ✓ la teneur en huile : le parabène subit une inactivation par complexation. (135)
- ✓ la présence d'agents de surface, essentiellement non ioniques, qui provoquent une solubilisation micellaire des conservateurs et la formation de complexes. (140)
- ✓ la présence de macromolécules employées fréquemment comme agents viscosants : PEG (polyéthylène glycol), sorbitol, esters de cellulose, gélatine, protéines, lécithine, polyvinylpyrrolidinones. (141)
- ✓ la présence de certains pigments, comme l'ultramarine, le talc, le dioxyde de titane, les oxydes de fer (rouge, jaune), qui peuvent diminuer par adsorption l'activité des parabènes. (142)

D'où leur utilisation conjointe avec d'autres conservateurs.

## **2.6. Autres effets des Parabènes :**

### **2.6.1. Effet myorelaxant :**

Des études sur tissus animaux réalisées *in vitro* ont porté sur les excipients du médicament Narcan® (naloxone), utilisé comme antidote des morphiniques. Les excipients étudiés comprennent 1,8 mg/ml de méthylparabène et 0,2 mg/ml de propylparabène, et ont montré des propriétés myorelaxantes qui n'étaient pas liées à des mécanismes cholinergique ou adrénergique. Le mécanisme a été relié à des phénomènes de capture et libération de calcium.

La transposition *in vivo* de cette action pharmacologique n'a pas été réalisée. Cependant, ces études *in vitro* ont mis en évidence la vigilance dont il faut faire preuve pour interpréter le bénéfice de la naloxone dans les chocs septiques, dans un essai *versus* placebo, quand celui-ci est sa phase excipient. (143)

### **2.6.2. Effet anesthésique :**

Les parabènes ont montré qu'ils possédaient une action anesthésique par de nombreuses expériences *in vitro* (étude sur animal) et *in vivo*. (144) De ce fait, il a été démontré que les méthylparabène, éthylparabène et propylparabène bloquaient la conduction nerveuse. (145)

L'effet obtenu avec 0,1% de méthylparabène est similaire à celui provoqué par 0,05% de procaine, anesthésique de référence. (146)

### **2.6.3. Effet sur les canaux sodium, voltage-dépendants :**

Une étude chez le rat a démontré que le propylparabène inhibe le courant de sodium au niveau des canaux voltage-dépendants de myocytes isolés sains, de manière dose-dépendante.

De plus, cette étude suggère que les canaux sodium voltage-dépendants sont impliqués dans le mécanisme de lésion durant la perfusion post-ischémie myocardique.

Le propylparabène est ainsi une molécule prometteuse pour la protection du myocarde par inhibition des canaux sodium, qui apparaissent comme étant une cible thérapeutique lors d'une perfusion suite à une ischémie myocardique. (147)

#### **2.6.4. Effet anti-bactérien contre les caries :**

La bactérie *Streptococcus sobrinus* est une des bactéries les plus cariogènes et son élimination est une étape essentielle dans la prévention et le traitement des caries.

Une étude de 2001 rapporte que les parabènes ont un effet antibactérien quand ils sont incorporés dans des bains de bouche. L'effet antibactérien observé vis-à-vis de ce streptocoque est d'autant plus important que la chaîne estérifiant l'acide parahydroxybenzoïque est courte. Ainsi on classe par ordre décroissant d'activité le méthylparabène, l'éthylparabène, le propylparabène et le butylparabène.

Un effet antibactérien synergique a été découvert parmi la combinaison de ces quatre parabènes sur la flore résidente comportant entre autres *S. sobrinus*. (148)

#### **2.6.5. Effet anti-oxydant :**

Une étude datant de 2005 démontre une activité anti-oxydante, croissante avec la longueur de la chaîne alkyle. On peut donc observer une activité anti-oxydante décroissante du propylparabène, de l'éthylparabène au méthylparabène, cette dernière étant considérée comme pratiquement négligeable. (145)

Une étude *in vitro* de 1985 montre que les méthylparabène, éthylparabène et propylparabène inhibent l'oxydation de l'éthanol et la réduction de l'acétaldéhyde. Les parabènes inhibent compétitivement les enzymes aldéhyde déshydrogénases. C'est bien le propylparabène le plus actif. L'inhibition de l'aldéhyde déshydrogénase affecte le métabolisme de l'éthanol, ce qui pourrait être utile pour l'étude de ce métabolisme et la prévention de l'intoxication au méthanol ou au propylène glycol. Cependant, l'inhibition de l'oxydation de l'éthanol *in vivo* n'a pas encore été démontrée. (149)

#### **2.6.6. Effet bronchodilatateur**

En 1973, une étude *in vitro* est réalisée sur une trachée isolée de porc de Guinée. Les méthylparabène et propylparabène induisent une relaxation de celle-ci, rapide, réversible et dose-dépendante. A une dose de 1,5 µg/ml, le propylparabène potentialise les effets de l'isoprotérénol et de l'AMP cyclique. Les investigateurs de cette étude suggèrent que l'effet bronchodilatateur des parabènes pourrait être dû à l'inhibition des phosphodiésterases.

## **2.7. Analyse des Parabènes dans les produits pharmaceutiques:**

### **2.7.1. Définition :**

Pour la quantification des parabènes dans les produits pharmaceutiques, qui se trouvent généralement en tant que composants mineurs, des méthodes analytiques sont conçues pour éviter les problèmes associés aux interférences provenant d'autres constituants. En effet, il existe plusieurs examens pour l'analyse des parabènes dans les aliments, les échantillons biologiques (151, 152) et les cosmétiques. (153, 154) Cependant, la littérature est médiocre en ce qui concerne l'analyse des parabènes dans les produits pharmaceutiques, il existe dans certaines revues, par exemple la revue publiée en langue chinoise par **Ho et Chen. (155)**

Selon la recommandation d'ICH :

- L'analyse de la teneur en agents antimicrobiens: **doit** généralement être réalisée lors de la mise en circulation. Dans certains cas, des tests en cours de fabrication peuvent suffire pour remplacer les essais avant la mise en circulation du produit fini. Si l'on effectue une analyse de la teneur en agents antimicrobiens en cours de fabrication, les critères d'acceptation doivent demeurer dans la spécification. (156)

### **2.7.2. Les méthodes les plus utilisées :**

Selon la pharmacopée européenne (157) Le dosage des parabènes implique une saponification suivie du titrage d'un échantillon et une méthode d'identification par CCM.

Des méthodes chromatographiques telles que la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), l'électrophorèse Capillaire (EC) et la spectrophotométrie UV ont été rapportées comme méthodes sélectives de dosage des parabènes dans les produits pharmaceutiques. Les méthodes d'analyse rapportées peuvent être classées comme suit :

#### **2.7.2.1.Électrophorèse capillaire :**

- **principe**

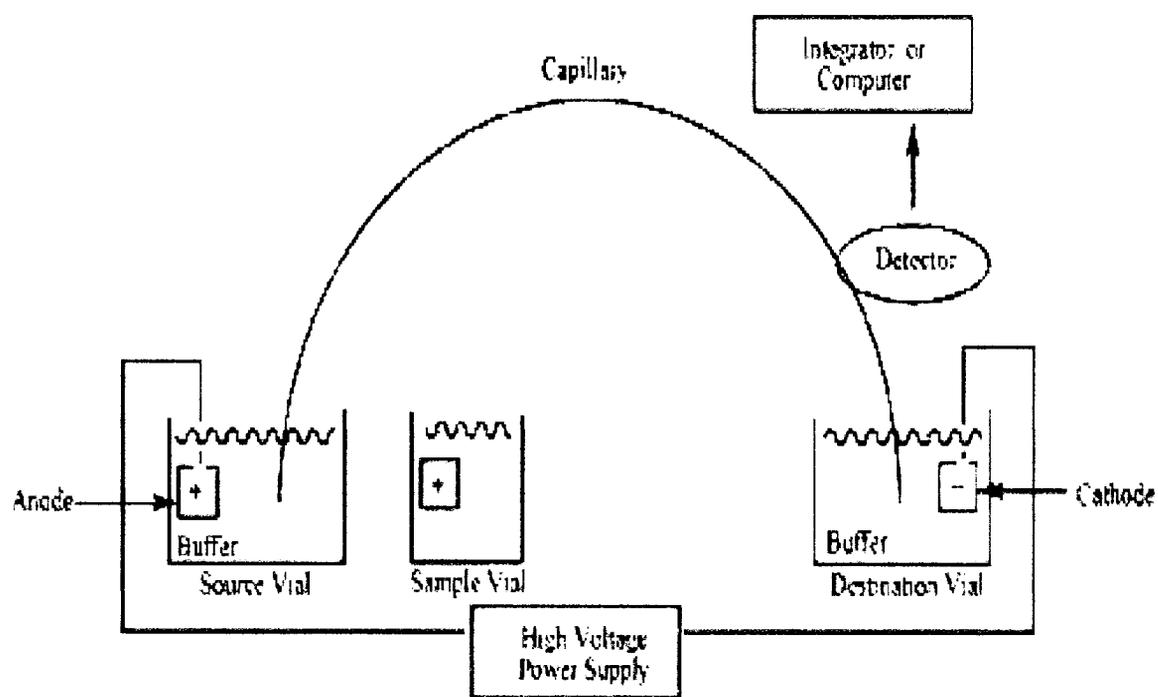
L'électrophorèse capillaire est une technique analytique utilisée pour séparer des composés d'un mélange selon leur charge et les forces de frottement qui s'exercent sur eux. Elle est conçue pour séparer des espèces chimiques selon leur rapport masse / charge à l'intérieur d'un

petit tube capillaire rempli d'un électrolyte.

En électrophorèse, les éléments chargés électriquement se déplacent dans le liquide conducteur sous l'influence d'un champ électrique.

- **Appareillage**

L'appareillage nécessaire pour réaliser une électrophorèse capillaire est relativement simple. Les principaux composants du système sont un flacon d'échantillon, deux flacons source et destination, un capillaire, des électrodes, une source de courant haute tension, un détecteur et un appareil de récupération et de traitement des données.



**Figure 14:** Schéma du système d'électrophorèse capillaire. (158)

- **Utilisation**

On a signalé une électrophorèse capillaire électrocinétique (EC) pour la détermination de méthyle, éthyle, propyle et butyle parabène dans des préparations cosmétiques en utilisant une

colonne capillaire en silice fondue et des tensions appliquées de 22, 25, 27 et 30 kV respectivement. La détection UV a été réalisée à 220 nm. (159)

- **Ho et Lee (160)** ont signalé un CE micellaire pour la détermination de l'acide hydroxybenzoïque et de ses esters méthyliques, éthyliques et propyliques (parabène) dans des préparations liquides par l'utilisation d'une colonne capillaire en silice fondue et une tension appliquée de 30 kV sous UV détection à 205 nm.

### 2.7.2.2. Chromatographie à haute performance HPLC :

- **Principe**

L'HPLC est l'une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyses chimiques. Elle permet l'identification, la séparation et le dosage des composés chimiques dans un mélange. Sa grande précision permet la recherche des traces et il est possible de la coupler à un spectromètre de masse. (161)

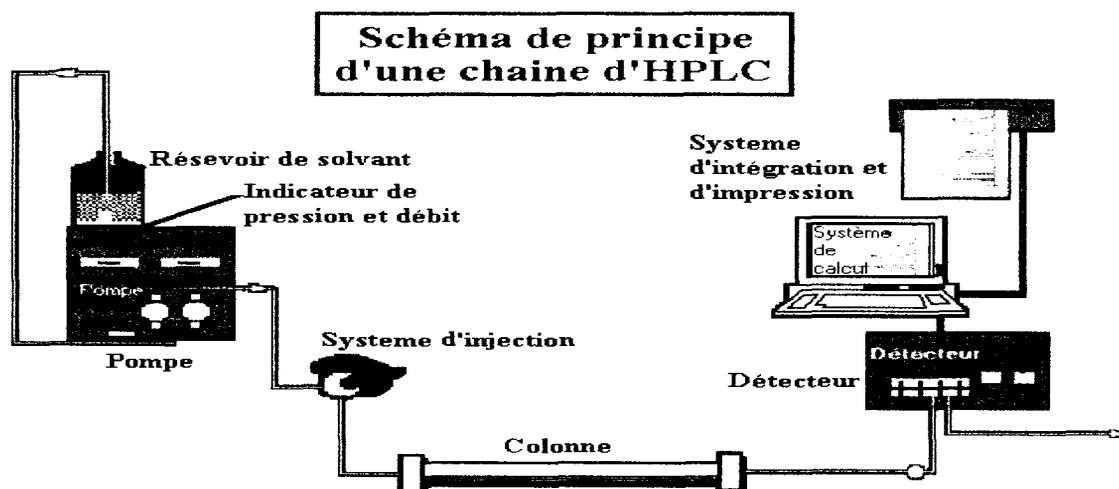


Figure 15: Schéma du principe du HPLC. (161)

- **Appareillage**

L'appareil de chromatographie liquide haute performance comporte les éléments de base suivants :

- ✓ un ou plusieurs réservoirs de phase mobile contenant soit des solvants purs soit des mélanges de solvants dans des concentrations connues ;
- ✓ un système d'injection comportant une boucle d'échantillonnage calibrée (généralement une vanne de RHEODYNE) ;
- ✓ une colonne remplie de quelques centimètres de long ;
- ✓ un détecteur permettant à la fois, de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun des solutés, dans le mélange.

Les principaux détecteurs utilisés sont les suivants : détecteur réfractométrique, détecteur U.V, détecteur à conductivité thermique, détecteur électrochimique.

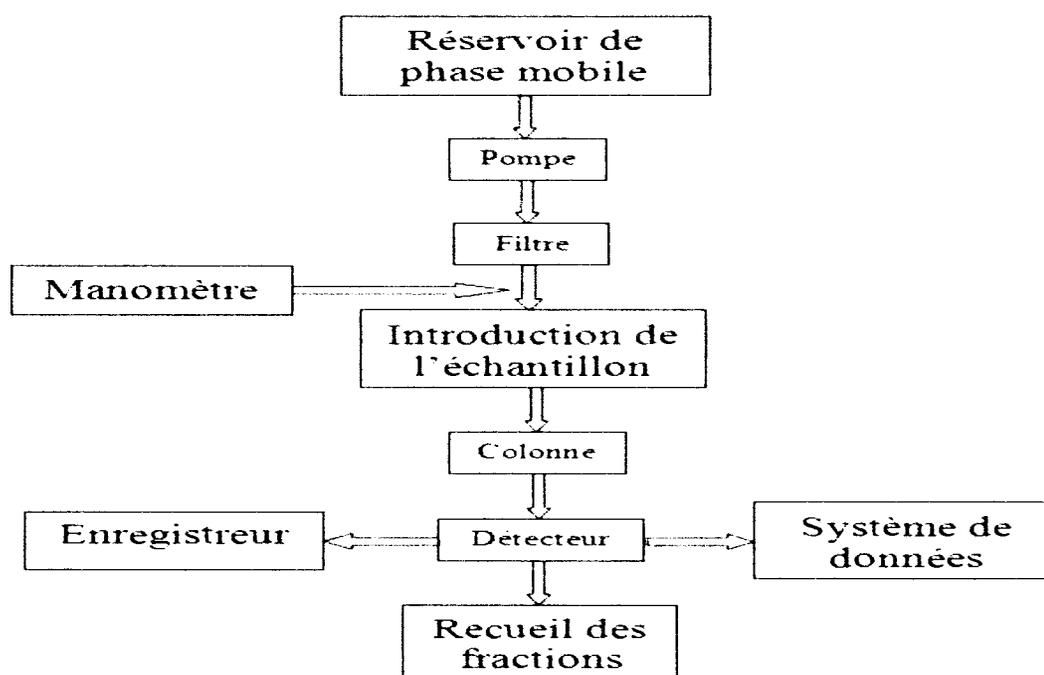


Figure 16: Appareillage simplifié de l'HPLC.

- **Utilisation**

La méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est la technique la plus appropriée pour les échantillons **complexes**. Ainsi, plusieurs méthodes de HPLC ont été rapportées pour la détermination des parabènes dans les produits pharmaceutiques.

Les colonnes C18 ou C8 régulières ou désactivées au silanol, associées à la détection UV-Visible, constituent la configuration la plus courante pour l'analyse des parabènes dans les produits pharmaceutiques et les cosmétiques.

On a quelques exemples pour les méthodes HPLC les plus récentes pour la détermination des parabènes dans divers produits pharmaceutiques :

- Dans les produits pharmaceutiques liquides : ont été déterminés par RP-HPLC (HPLC en phase inversé) en utilisant une colonne C18 dont la phase mobile est un mélange de méthanol et de tampon phosphate à pH 7,05, la détection a été effectuée à 254 nm. **(162)**
- On a également signalé la RP-HPLC avec colonne C18 pour le dosage des méthyles et propyl parabène en plus de l'hydrocortisone et de ses produits de dégradation dans une crème topique. **(163)** La phase mobile était un mélange de méthanol-acétonitrile et d'eau, la détection a été effectuée à 238 nm.
- Une configuration similaire, avec différentes phases mobiles de pH (pH 2,5), a été utilisée pour l'analyse des parabènes avec **le diclofénac sodique** et ses produits de dégradation. **(164)**
- Une autre configuration RP-HPLC, avec une phase mobile différente (à pH 3,45 avec l'acide acétique glacial), a été utilisée pour l'analyse des parabènes avec l'expectorant ambroxol. La détection a été effectuée à 247 nm. **(165)**

### 2.7.2.3. Chromatographie sur couche mince :

- **Principe**

La chromatographie sur couche mince (CCM, en anglais TLC pour Thin layer chromatography) est une technique de chromatographie planaire<sup>1</sup> dont la phase mobile est liquide. Elle est couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse (CCM analytique) ou de purification (CCM préparative).

Elle comprend:

- une phase stationnaire : une couche mince de matériel absorbant (usuellement du gel de silice, de l'oxyde d'aluminium ou de la cellulose).
- une phase liquide, dite phase mobile ou éluant : un solvant ou un mélange de solvants qui va entraîner les composés à séparer le long de la phase stationnaire.

Le phénomène d'adsorption est prépondérant (mais il y a également partage si le solvant est un mélange) pour les phases stationnaires polaires. Dans le cas des phases inverses, c'est-à-dire hydrophobes, c'est le phénomène de chromatographie de partage qui prédomine. (166)

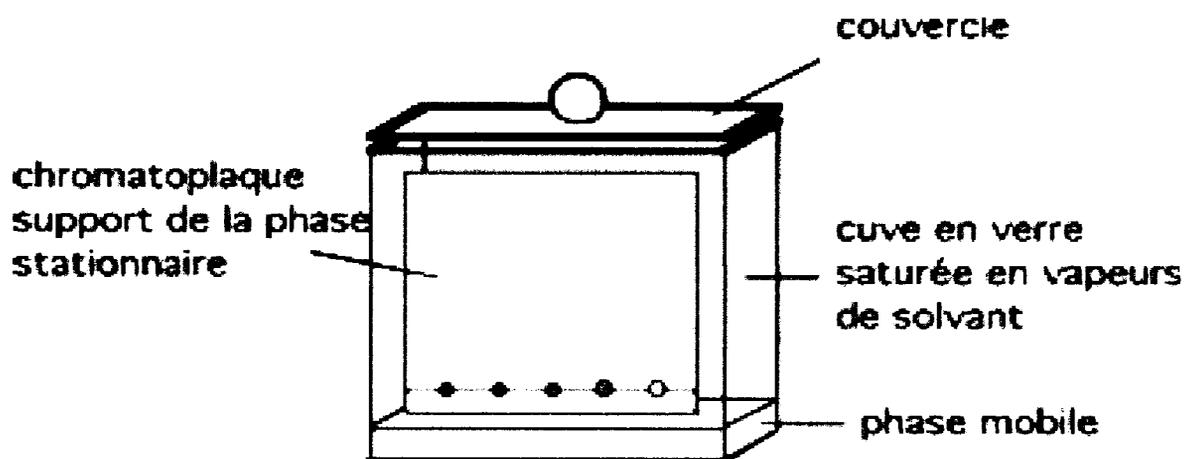
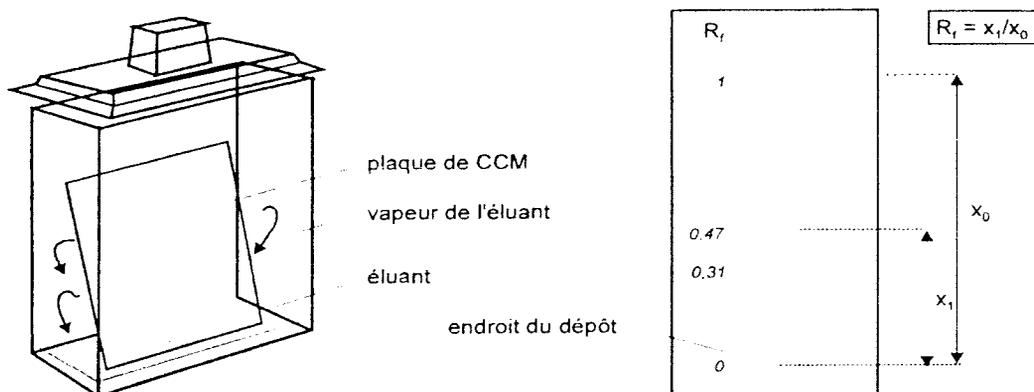


Figure 17: Schéma de principe du CCM. (166)

- **Appareillage**

L'appareillage permet de maîtriser les trois étapes essentielles de la chromatographie sur couche mince : le dépôt de l'échantillon, la migration sur la plaque et la mesure de la concentration. (167)



**Figure 18:** Appareillage d'une chromatographie sur couche mince. (167)

- **Utilisation**

Plusieurs procédures de chromatographie sur couche mince (CCM) et HP-CCM ont été rapportées pour la détermination de parabènes dans les produits pharmaceutiques.

- La Pharmacopée européenne(157), spécifie une méthode de CCM pour la détection de parabènes dans les composés pharmaceutiques.

Par exemple : la détermination des parabènes dans les peptides antibiotiques, les pommades à la néomycine sulfate, à la polymyxine B sulfate et à la bacitracine de zinc se fait par CCM, en utilisant un mélange d'acide acétique glacial n-pentane comme phase mobile. La détection a été effectuée par mesure densitométrique à 260 nm.

- De même, les parabènes en suspension antiacide ont été déterminés à l'aide de plaques RP-CCM. La détection a été effectuée par mesure densitométrique à 254 nm.
- Une procédure similaire a été mise au point par Thomassin et al, où une étude comparative de l'application de HP-CCM et de HPLC dans l'analyse des parabènes a été lancée. Pour HP-CCM, des plaques RP-CCM fluorescentes ont été utilisées et la détection a été effectuée à 260 nm. Pour la HPLC, une colonne C18 a été utilisée avec du méthanol aqueux en tant que phase mobile et une détection UV à 254 nm.

#### 2.7.2.4. Spectrophotométrie UV-visible:

- **Principe**

La spectroscopie ultraviolet-visible ou spectrométrie ultraviolet-visible est une technique de spectroscopie mettant en jeu les photos dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (100nm - 100nm) du visible (400nm – 750nm) ou du proche infrarouge(750nm-1400nm). Soumis à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde, les molécules, les ions ou les complexes sont susceptibles de subir une ou plusieurs transitions électroniques. Cette spectroscopie fait partie des méthodes de spectroscopie électronique. Les substrats analysés sont le plus souvent en solution, mais peuvent également être en phase gazeuse et plus rarement à l'état solide. (168)

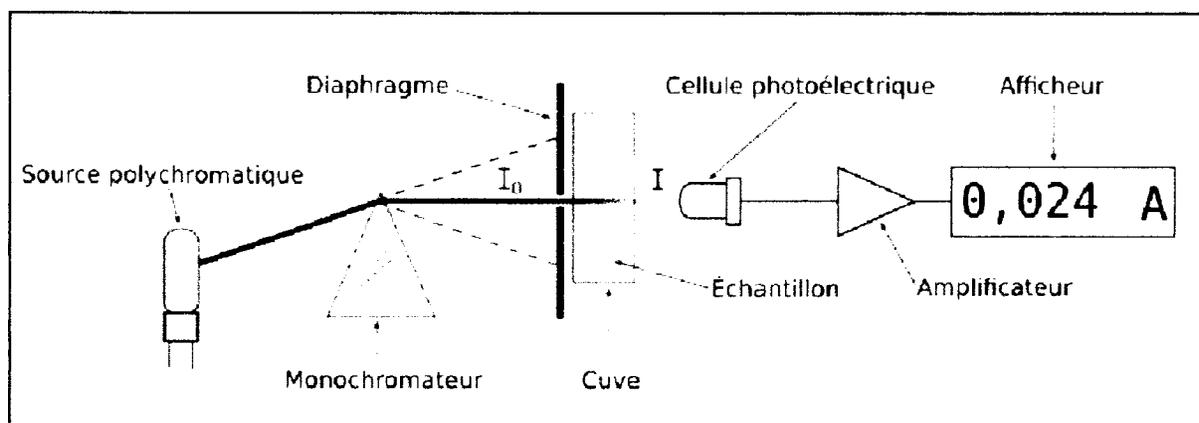


Figure 19: Schéma du principe de spectrophotométrie UV-visible. (168)

- **Appareillage**

L'appareillage est assez simple et extrêmement robuste. Il ne nécessite pas d'entretien fréquent à part celui de la cuve (amovible) qui doit être parfaitement propre et sans rayures. Il existe également des cuves jetables pour une plus grande facilité d'entretien. Il est constitué d'une lampe (source du rayonnement) émettant dans tout le spectre UV-visible (lampe avec filament de tungstène, ou à arc au xenon par exemple), d'un monochromateur et d'un détecteur du rayonnement final. Le tout est relié à un ordinateur qui en permet le contrôle. Le monochromateur permet de sélectionner les longueurs d'onde de travail. Il est basé sur le principe d'un réseau de diffraction permettant de séparer les longueurs d'onde à la manière

d'un prisme. Pour un bon fonctionnement, la lampe doit être régulièrement changée. Le réseau de diffraction doit être vérifié afin de s'assurer qu'il n'y a pas un décalage entre la longueur d'onde demandée et la longueur d'onde réelle. Pour ce faire au moins une fois par an, des filtres très précis sont placés à la place de la cuve et l'on vérifie que la longueur d'onde détectée correspond bien à la longueur d'onde théorique

- **Utilisation**

La spectrophotométrie UV-visible est toujours considérée comme une méthode commode et peu coûteuse pour la détermination des conservateurs. Plusieurs méthodes spectrophotométriques et colorimétriques ont été rapportées pour la détermination des parabènes (méthyle parabène et propyl parabènes) dans les matériaux en vrac.

Chapitre 3 :  
Alternatives aux  
usages des Parabènes

Dans les produits pharmaceutiques, les parabènes sont largement utilisés pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques. Un article du quotidien *Le Monde*, parue le 13 septembre 2013, citait que 40 % des produits d'hygiène et beauté contenait au moins un perturbateur endocrinien, les parabènes étant le perturbateur endocrinien le plus utilisé (23 %) (W12). C'est la raison pour laquelle aujourd'hui, la tendance est au « **Sans Parabènes** » afin d'attirer les personnes réticentes à cette famille chimique.

En additionnant les risques suspectés aux risques avérés pour la santé, il apparaît judicieux de se tourner vers **des alternatives** afin de diminuer leur utilisation dans un premier temps, puis de les supprimer définitivement par la suite. (W12)

### **3.1. La mention « Sans Parabènes » ça veut dire quoi ? :**

#### **3.1.1 Sans Parabène = Sans conservateur**

L'on rencontre certains produits cosmétiques estampillés "Sans Parabènes" alors que leur formule ne nécessite nécessairement de conservateur pour assurer leur sécurité bactérienne et microbiologique. L'approche, certes, n'est pas mensongère, mais relève du pur marketing, et n'est certainement pas une information réellement pertinente pour le consommateur.

#### **3.1.2. Sans Parabène = Avec d'autre conservateur**

Le consommateur associe souvent cette mention à un produit sain et la comprend comme désignant un produit exempt de substance synthétique conservatrice. C'est parfois vrai, mais il arrive aussi que cette interprétation soit tout à fait erronée. Il faut alors comprendre le "Sans Parabènes" dans son acception la plus stricte. Sans parabènes veut dire sans les composés conservateurs de la classe des parabènes, sans plus. On peut ainsi trouver dans le produit d'autres composés conservateurs, souvent d'origine synthétique, et aux effets potentiels irritants, allergisants ou toxiques plus problématiques encore que ceux associés à l'utilisation des parabènes.

#### **3.1.3. Sans Parabène = Sans Parabène ajouté**

Dans ce cas, aucun parabène n'a en effet été ajouté à la formule pour assurer sa conservation. Ce qui n'empêche pas qu'on puisse en trouver tout de même dans le produit. Il y

est le plus souvent par le biais d'un ou de plusieurs ingrédients conservés, eux, à l'aide de parabènes qui se retrouvent dans le produit fini, en faible quantité, certes, mais présents tout de même. Dans ce cas, l'allégation est, de fait, mensongère

### **3.2. Loi anti parabènes : Loi Lachaud**

Le 13 Juillet 2010, une proposition de loi française émanait d'Yvan Lachaud. Un texte des plus simples comprend un article unique : "**La fabrication, l'importation, la vente ou l'offre de produits contenant des phtalates, des parabènes ou des alkylphénols sont interdites.**"

Cette proposition a été renvoyée à la Commission des Affaires Sociales et examinée lors de la séance du 05 avril qui a rejeté l'ensemble de la proposition de loi, interdiction ou même suspension de ces substances.

Le 03 Mai 2011, l'Assemblée Nationale votait par 236 voix contre 222 voix l'interdiction de ces conservateurs, ainsi que des phtalates et des alkylphénols, tous suspectés d'agir en perturbateurs endocriniens et d'avoir de graves répercussions sur la santé humaine, notamment en termes de malformations des fœtus et de baisse de la fertilité. À ce jour, la proposition de loi Lachaud ne figure pas à l'ordre du jour du Sénat mais l'inquiétude règne dans **les secteurs industriels concernés**, qui se verraient obligés, en cas **d'adoption définitive**, de trouver des **substances de remplacement**. (W11)

### **3.3. Les recommandations émises par les Autorités de santé et les instances scientifiques :**

#### **3.3.1. Food and Drug Administration :**

La Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FD&C Act) est responsable de l'approbation des ingrédients utilisés dans les cosmétiques. Néanmoins, en raison de son rôle majeur dans l'amélioration de la santé publique, la FDA a émis le 24 mars 2006 un avis sur l'utilisation des parabènes dans les cosmétiques. L'Agence a ainsi précisé qu'il n'y avait pas de **dangers immédiats** pour les consommateurs à utiliser des cosmétiques contenant des parabènes. Néanmoins, elle précise qu'elle continuera d'évaluer les nouvelles données dans ce domaine et qu'elle avertira le public et les industriels, par le biais de la FD&C Act, si un risque pour la santé se précisait.

### 3.3.2. European Medicine Agency :

Les parabènes font partie des excipients qui doivent être révisés prioritairement par la Commission Européenne dans la nouvelle « *Guideline on Excipients in the Label and Package Leaflet of Medicinal Products for Human Use* »(169).

L'EMA a mis en ligne le 25 avril 2013 un projet de recommandations ouvert à commentaires, qui a pour objectif d'apporter les dernières connaissances scientifiques sur deux parabènes très utilisés dans les médicaments administrés par voie orale : le méthyl et propyl parabènes(170). Ce projet de recommandations n'est toujours pas finalisé à ce jour.

En effet, initialement connu pour leur effet allergène, de nouvelles données de toxicité doivent être prises en considération afin d'adapter les mentions qui seront apposées dans la notice et l'étiquetage des médicaments.

Ainsi, l'utilisation du méthyl parabène jusqu'à 0,2 % dans les médicaments administrés par voie orale, y compris pour la population pédiatrique, est jugée sans danger.

Concernant le propyl parabène, une DJA de 5 mg/kg/jour a été définie pour les adultes et les enfants de plus de deux ans. Par contre, aucune DJA n'a pu être établie pour les enfants de moins de deux ans. Par conséquent, son utilisation dans les médicaments destinés aux enfants âgés de moins de deux ans doit être justifiée en réalisant une évaluation bénéfices/risques, qui doit prendre en compte plusieurs facteurs :

- ✓ la posologie ;
- ✓ la concentration en propyl parabène ;
- ✓ la durée du traitement ;
- ✓ la sévérité de la maladie ;
- ✓ l'existence d'alternatives thérapeutiques.

### 3.3.3. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé :

L'ANSM s'intéresse à la question des parabènes dans les médicaments depuis 2004, date qui correspond à la publication de l'étude de **Philippa Darbre** qui conclut à la présence de parabènes dans des biopsies de tumeurs du sein. Depuis, l'ANSM ne cesse de surveiller cette

famille chimique afin d'améliorer les connaissances et de proposer des recommandations dans l'unique but de protéger la population. (171)

Autre que le risque allergisant connu de ces conservateurs qui est mentionné dans la notice, l'ANSM précise que les autres risques ne sont pas démontrés pour l'instant. Par conséquent, le rapport bénéfices/risques de ces médicaments n'est pas remis en cause.

En mars 2009, dans un bulletin publié par l'ANSM (ex-AFSSAPS), une mise au point est faite sur la sécurité d'utilisation des parabènes dans les médicaments. En raison des résultats controversés sur les effets des parabènes, plusieurs institutions européennes dans les domaines de l'aliment, des cosmétiques et du médicament concluent sur la nécessité de mettre en œuvre des études expérimentales supplémentaires afin de mieux préciser le risque sur la fertilité pour l'homme. L'ANSM précisait qu'elle travaillait dans ce sens avec plusieurs laboratoires qui Commercialisent des médicaments utilisés en pédiatrie et contenant du propyl parabène comme conservateur.

#### **Les résultats de recherche**

Le 25 mai 2011, l'ANSM (ex-AFSSAPS) sort un document intitulé « Questions/Réponses » pour faire le point sur la présence des parabènes dans les médicaments(171).

Autre que le risque allergisant connu de ces conservateurs qui est mentionné dans la notice, l'ANSM précise que les autres risques ne sont pas démontrés pour l'instant. Par conséquent, le rapport bénéfices/risques de ces médicaments n'est pas remis en cause.

En effet, à l'heure actuelle, **il n'existe pas d'alternatives** chimiques avec un meilleur profil de sécurité et une efficacité de conservation égale aux parabènes. Et bien que l'agence comme les autorités européennes incitent les laboratoires à privilégier les méthodes physiques de conservation, cela n'est pas toujours possible, notamment dans le cas des formes buvables.

Enfin, suite à l'alerte de l'étude de Philippa Darbre, l'ANSM a recensé les médicaments contenant des parabènes, et en a identifié 400 au total, dont 306 contenant du propyl parabène, suspecté de présenter un risque pour la fertilité. Néanmoins, l'agence s'est refusée à publier une liste de ces médicaments, qui aurait peu d'intérêts selon elle, car l'analyse de risque doit tenir compte de plusieurs facteurs : le type de parabènes et sa concentration, la population exposée (en sachant que la population pédiatrique et les femmes enceintes et allaitant sont considérées comme particulièrement à risque), et la voie d'administration.

### **3.3.4. Académie Nationale de Pharmacie :**

Le 22 mai 2013, l'Académie Nationale de Pharmacie a publié un document intitulé « Parabènes & médicaments : un problème de santé publique ? » pour donner son point de vue et émettre des recommandations sur l'utilisation des parabènes dans les médicaments (172).

Ainsi, les principales recommandations étaient :

- ✓ ne pas interdire l'usage général des médicaments renfermant des parabènes, car ces derniers possèdent un rapport bénéfices/risques positif, par rapport aux éventuelles conséquences (altération de la conservation des médicaments, augmentation des effets secondaires dus aux bactéries et champignons susceptibles de se développer) ;
- ✓ encourager les formulations alternatives, ou des formes à usage unique, pour éviter l'utilisation de conservateurs, principalement pour la population pédiatrique ;
- ✓ évaluer au cas par cas le rapport bénéfices/risques de l'utilisation de médicaments contenant des parabènes chez les femmes enceintes ;
- ✓ s'assurer de la nécessité de l'usage de conservateurs dans la formulation lors du développement de nouveaux médicaments ;
- ✓ se conformer à l'essai d'efficacité de conservation antimicrobienne de la Pharmacopée Européenne pour un médicament qui nécessiterait un conservateur, et ce afin de déterminer sa concentration minimale et de privilégier les conservateurs ayant déjà fait la preuve de leur innocuité.

### **3.4. Alternatives proposées :**

Les possibilités de substitution des parabènes par d'autres conservateurs sont actuellement limitées, car de nombreux autres conservateurs ne sont pas aussi efficaces et ne présentent pas une aussi bonne tolérance et autant de données de sécurité. Ceux-ci ont d'ailleurs remplacé d'autres conservateurs comme le sucre, source de caries dentaires, ou l'alcool dont les effets toxiques sont bien connus.

### 3.4.1. Dans les médicaments :

#### 3.4.1.1. L'association de conservateurs :

Dans un rapport publié en mai 2013, l'Académie Nationale de Pharmacie proposait de combiner divers parabènes pour en diminuer leur concentration finale, car ces derniers sont connus pour leur effet synergique une fois associés, ou encore de les associer à d'autres conservateurs(172). **Les auteurs de cette étude** ont combiné les méthyl, éthyl, propyl et butyl parabènes dans diverses proportions et examiné **leur activité** vis-à-vis de microbes in vitro et in situ dans des **préparations ophtalmiques et topiques**, sachant que la concentration totale de parabène était la même. Ils concluaient que les mélanges comprenant, soit 47 % M, 23,5 % E, 6,0 % P, 23,5 % B, soit 44,5 % M, 44,5 % P, 11,0 % B à 0,05-0,1 % w/v représentent une **amélioration** par rapport au mélange habituellement utilisé de 50 % M, 35 % E, 10 % P, 5 % B. Quant à l'association avec d'autres conservateurs, une étude déjà assez ancienne avait montré que de faibles concentrations de propylène glycol avaient un effet potentialisateur sur celui des parabènes. (173)

Par ailleurs, une ancienne étude avait montré que le propylène glycol avait un effet potentialisateur sur celui des parabènes. (174)

#### 3.4.1.2. Les méthodes physiques de conservation :

Afin de limiter la présence de conservateurs dans les médicaments, l'ANSM comme l'EMA incitent les laboratoires à privilégier les méthodes physiques de conservation.

- **Modifier le conditionnement :**

Certains laboratoires pharmaceutiques ont développé des conditionnements permettant de conserver le contenu sans conservateur. A titre d'exemple, les Laboratoires Théa ont développé un flacon multidose qui assure la stérilité des collyres, grâce à une membrane filtrante, sans utiliser de conservateurs : il s'agit du flacon ABAK®(175).

Ce conditionnement convenant moins aux solutions visqueuses et aux gels, les laboratoires Théa ont donc développé un autre procédé : un tube bénéficiant d'un remplissage aseptique qui permet de conserver le produit stérile après ouverture. Ce type de technologie, disponible depuis janvier 2013, est pour le moment réservé aux domaines de l'hygiène des paupières et de la dermo-cosmétique.

- **Stériliser la préparation dans le contenant final :**

Pour les médicaments, il existe actuellement plusieurs méthodes de stérilisation (par la chaleur humide, par la chaleur sèche, par irradiation gamma, par l'oxyde d'éthylène), utilisées en fonction des caractéristiques physico-chimiques du contenant et du contenu. La stérilisation par la chaleur humide est la méthode de référence, capable de stériliser de nombreux matériaux (verre, métal, plastique thermostable), des solutions aqueuses dans le conditionnement (injectables en ampoule) tant que le principe actif est thermostable.

Il paraît envisageable de stériliser des préparations pédiatriques, représentées globalement par les suspensions buvables telles que les sirops, mais la stérilité ne pourrait être assurée après l'ouverture du flacon entraînant un risque de contamination microbienne.

Le développement d'un nouveau flacon, qui assurerait la stérilité du contenu après l'ouverture de celui-ci, semble être une solution à envisager dans le futur.

- **Développer des préparations unidoses :**

Par définition, elles ne possèdent pas de conservateurs. Néanmoins, ce type de conditionnement possède certains inconvénients : il est peu écologique en raison du nombre élevé d'unidoses nécessaire pour un traitement par rapport à un flacon multidose, il est onéreux et il n'est pas aisé dans sa manipulation, surtout pour les personnes âgées.

### **3.4.2. Dans les produits cosmétiques :**

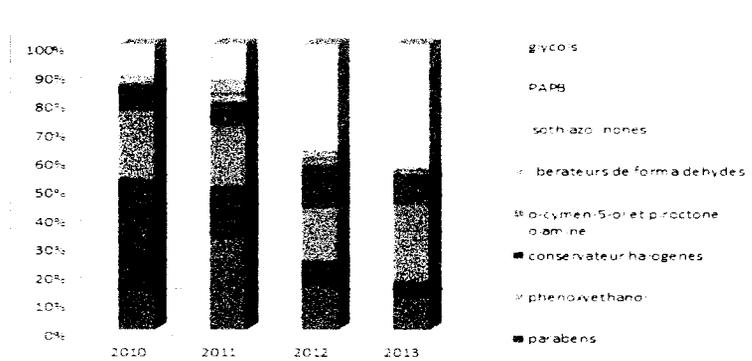
Selon les industriels des cosmétiques, les parabènes sont considérés comme des conservateurs « idéaux » du fait notamment de leur importante efficacité, de leur compatibilité avec un très grand nombre de formulations, et du fait qu'ils présentent un risque très faible de réactions allergisantes chez le consommateur.

La question de leur substitution est donc complexe puisque peu, voire pas, d'autres conservateurs présentent tant d'avantages. En particulier, des expériences récentes de substitution à grande échelle ont pu conduire à l'usage de substances présentant des effets secondaires indésirables.

#### **3.4.2.1. Alternatives chimiques :**

Une importante campagne de reformulation résulte de ce contexte médiatique non

favorable aux parabènes dont l'utilisation connaît une nette diminution entre 2010 et 2013 ; le phénoxyéthanol et le méthylisothiazolinone sont les principaux substitués aux parabènes utilisés en cosmétique (Fig20).

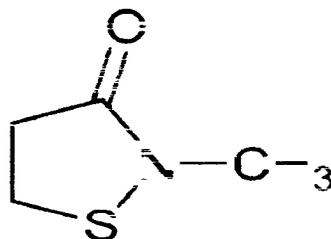


**Figure 20 :** Evolution de la nature du conservateur et de la concentration utilisée dans les produits cosmétiques analysés par la société COSMEPAR entre 2010 et 2013 [W1].

- **Methylisothiazolinone (MIT) :**

Conservateur du groupe des isothiazolinones, utilisé dans de nombreux produits cosmétiques rincés et non-rincés, son usage est réglementé au niveau européen (Annexe V du Règlement

1223/2009/EC du Parlement Européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux Produits Cosmétiques) ; sa concentration doit être inférieure ou égale à 0,01% (100 ppm).



**Figure 21 :** Structure chimique du Methylisothiazolinone (MIT) (W2).

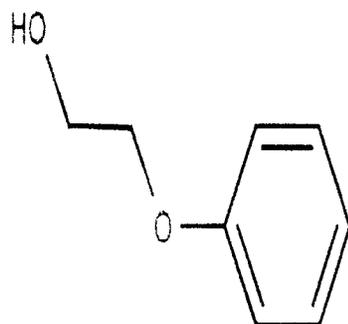
Selon la Société Française de Dermatologie (SFD) [W3], le MIT entrainerait un nombre croissant d'irritations et d'eczémas, notamment sur les mains, visage et siège avec l'utilisation de plus en plus répandue des lingettes

Le CSSC a rendu son avis en décembre 2013[W4] qui confirme l'augmentation importante depuis 2010-2011 du nombre de cas de sensibilisation la MIT dans divers pays d'Europe dont la France, avec une moyenne de 2 à 4% de personnes souffrant d'eczéma de contact et réagissant positivement au MIT lors de tests épicutanés soit sensibilisées à cette substance. Des réactions d'allergie ont par ailleurs été observées chez des personnes sensibilisées exposées à des concentrations très faibles de MIT, < 15 ppm. Le CSSC recommande donc de ne plus utiliser le MIT dans les produits cosmétiques non rincés et de limiter la concentration dans les produits rincés à des niveaux garantissant l'absence de réactions d'élicitation(0,0015% soit 15 ppm). De plus, le CSSC attire l'attention sur les risques liés à une exposition via d'autres types de produits comme les produits ménagers, notamment chez des personnes déjà sensibilisées.

L'association très fréquente du Methylisothiazolinone / Methychlorolisothiazolinone est dotée d'un potentiel allergisant encore plus fort. La réglementation européenne en a tenu compte en limitant dans ce cas la concentration maximale d'un mélange Methylchlorolisothiazolinone et Methylisothiazolinone dans un rapport 3:1 dans les produits finis à 0,0015 %.

- **. Phénoxyéthanol :**

Le phénoxyéthanol est un dérivé de l'éthylène glycol appartenant à la famille des éthers de glycol possédant un noyau benzénique et une fonction alcool(Fig.22). Il se présente sous la forme d'un liquide huileux et non volatil, son utilisation répandue est due à sa stabilité et sa bonne compatibilité avec la majorité des matières premières cosmétiques.



**Figure 22 :** Structure chimique du phénoxyéthanol [W5].

Le phénoxyéthanol est utilisé en tant que conservateur dans les produits cosmétiques. Il est à ce titre soumis à la réglementation européenne relative aux produits cosmétiques (Directive 76/768/CEE modifiée<sup>4</sup>, Annexe VI, Entrée 29) qui limite sa concentration maximale d'utilisation à 1% dans les produits cosmétiques. Il reste l'un des conservateurs les plus utilisés dans l'industrie cosmétique, seul ou en association avec d'autres conservateurs (Afssaps, 2009).

Selon un rapport de l'ANSM établi en Mai 2012 [W6], le phénoxyéthanol est absorbé par voie orale et cutanée. Il est métabolisé, principalement par le foie, en acide phénoxyacétique et est éliminé essentiellement dans les urines. Il présente une faible toxicité aiguë pour l'animal, il n'est ni irritant pour la peau ni sensibilisant et provoque une irritation oculaire modérée à sévère. Une exposition répétée induit une nocivité variable selon les espèces, hématotoxicité chez le lapin et hépatotoxicité chez le rat.

L'ANSM a émis des recommandations pour les produits destinés aux enfants de moins de 3 ans, l'évaluation des risques à destination des produits utilisés dans les érythèmes fessiers a abouti à une sécurité insuffisante ne pouvant pas garantir une sécurité d'utilisation optimale.

De ce fait, il a été établi par l'Agence que les produits destinés à la toilette du siège des bébés doivent être exempts de ce composé. Pour l'ensemble des autres soins bébé, la teneur maximale de phénoxyéthanol doit être réduite à 0,4% en raison d'effets hépatotoxiques relatés. Ces valeurs prennent en compte la possibilité d'exposition cumulée.

### 3.4.2.2. Alternatives techniques :

La commercialisation de produits cosmétiques stables contenant la quantité minimale de conservateur nécessaire ou n'en possédant pas du tout représente donc aujourd'hui un réel besoin aussi bien qu'un véritable challenge technologique. Dans ce contexte, le conditionnement primaire joue un rôle majeur et doit être force de propositions. Les industriels rivalisent d'innovations afin de créer des conditionnements primaires innovants, permettant de limiter, voire même de supprimer, la quantité en agents antimicrobiens introduits.

- **Tube monodose :**

Il représente le moyen le plus classique évitant une contamination microbienne dans un cosmétique, le conditionnant en unidoses (176).

Le conditionnement est stérile et peut donc être utilisé pour des formules qui ne contiennent aucun conservateur. Il garantit l'efficacité des actifs qu'il contient pendant trois jours maximum. Au-delà de cette date, la stérilité n'est plus assurée car ce conditionnement n'empêche pas l'entrée d'air. L'un des inconvénients majeurs est la quantité de matériaux de conditionnement utilisée qui se trouve être décuplée pour un volume de produit donné par rapport aux multidoses.

Cette méthode est peu rentable, peu économique et peu écologique mais reste tout de même relativement utilisée dans des monodoses stériles de démaquillant qui conviennent aux yeux très sensibles et n'ayant aucune autre alternative en terme de démaquillant.

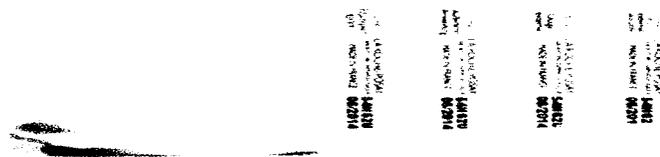


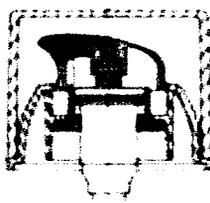
Figure 23 : Monodoses stériles de démaquillants yeux Toleriane de LaRoche-Posay® [W7].

- **Flacon Airless :**

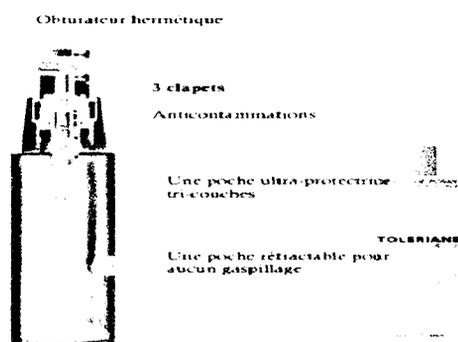
Le but d'un doseur Airless est d'empêcher toute entrée d'air dans le contenant qui pourrait oxyder la formule et la dégrader (177). Cette technologie est ancrée au conditionnement primaire, soit au récipient même, qui présente aussi l'avantage de n'entraîner aucune perte de produit par l'intermédiaire d'une poche rétractable.

C'est un conditionnement multidoses mais qui n'est pas stérile. Il n'est donc pas adapté à des formules ne contenant aucun conservateur ; il existe dans ce flacon *airless*, au niveau de la tête doseuse, un espace mort qui n'évite pas une rétro contamination possible. Il est donc impératif que la formule contenue dans ce type de conditionnement contienne des conservateurs.

Mécanisme breveté pour les  
flacons doseurs



**Figure 24 :** Le système Airless est exploité dans le soin Toleriane Ultra de LaRoche-Posay®, présenté en flacon pomp



**Figure 25 :** Flacon pompe du soin Toleriane Ultra de LaRoche-Posay® [W8]

- **Système UHT :**

Le laboratoire CL Tech s'est intéressé au principe de la stérilisation UHT du lait, qu'il a adapté ensuite aux formulations cosmétiques. Ce procédé consiste à chauffer la formule à très haute température (135°C) pendant une durée très courte (3 à 7 secondes) puis refroidissement, ce qui permet une élimination quasi-complète des microorganismes et la non-altération des principes actifs (178). Cette méthode de conservation pour les cosmétiques est brevetée par les Laboratoires Dermatherm. Les soins qu'ils proposent sont donc stériles grâce à cette méthode, et sont ensuite conditionnés dans des flacons-pompes airless à protection de l'air et de la lumière, dont le bouchon est recouvert par un film antimicrobien nettoyant la valve et bactéricide. Ce film recrée une zone stérile sous le bouchon lorsque celui-ci est repositionné

### 3.4.2.3. Adaptation des formulations : Autoprotection

- **Activité de l'eau :**

Afin de survivre et de se développer, les micro-organismes doivent maintenir un état de turgescence à l'intérieur des cellules, phénomène possible par osmose avec le milieu extracellulaire (179). Par conséquent, afin d'assurer leur croissance et leur multiplication, les micro-organismes doivent être en présence d'eau en quantité suffisante. De ce fait, une notion d'activité de l'eau, ou disponibilité de l'eau, a été définie, elle représente les forces de liaisons entre l'eau et les constituants du produit.

L'activité de l'eau (water activity) correspond à la mesure des molécules d'eau non complexées. Elle est symbolisée par l'indice aw (allant de 0 à 1) et par la formule suivante (180).

$$Aw = P / P_0$$

Avec :

**P** : pression de vapeur de la solution (Pa).

**P<sub>0</sub>** : pression de vapeur de l'eau pure (Pa) mesurée à température constante.

Par définition, la pression de vapeur est la pression sous laquelle la formule est en équilibre

avec sa vapeur à une température constante.

Ainsi, plus la valeur de  $a_w$  est élevée et se rapproche de 1, plus la prolifération des microorganismes est importante en raison de la dilution de l'eau. Chaque espèce de microorganisme étant spécifique, la valeur minimale de l' $a_w$  pour laquelle la multiplication cellulaire peut avoir lieu varie. Typiquement, les levures et moisissures peuvent se développer à des valeurs d' $a_w$  plus faibles que les bactéries.

**Tableau 9:** Valeurs d' $a_w$  minimales permettant la croissance de microorganismes représentatifs, à 25°C (179).

Microorganismes	$A_w$ minimum
<b>Bactéries</b>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>0,97</b>
<i>Escherichia coli</i>	<b>0,95</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>0,86</b>
<b>Levures et moisissures</b>	
<i>Aspergillus niger</i>	<b>0,77</b>
<i>Candida albicans</i>	<b>0,87</b>

Il est possible d'ajouter des humectants afin de diminuer la valeur de l'activité de l'eau telle que le chlorure de sodium, l'éthanol, le lactate de sodium, le propylène glycol, le glycérol,

le sorbitol ainsi que le glucose. Les fonctions hydroxyles des humectants permettent la formation de liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau, induisant une réduction de l' $a_w$ . Les sels inorganiques ainsi que les hydrocolloïdes (gomme de xanthane, gomme de guar ou autres), utilisés pour augmenter la viscosité des formulations, abaissent également la valeur de l' $a_w$  en formant un réseau tridimensionnel qui limite la mobilité des molécules d'eau dans le milieu (179,180)

- **pH :**

Tout microorganisme possède un pH de croissance optimum (Tab.10). Les pH de croissance se situent généralement entre 5 et 8. D'une manière générale, les bactéries se développent mieux dans des milieux proches de la neutralité alors que les levures et moisissures sont généralement acido-résistantes avec un pH de croissance optimum se situant entre 4 et 6 mais avec des valeurs extrêmes de 2 à 9 pour les levures et de 2 à 11 pour les moisissures (179).

**Tableau 10:** Domaines de pH de croissance des microorganismes (179).

Microorganismes	pH de croissance
Bactéries	4,0 - 9,0
Levures	1,5 - 8,0
Moisissures	5,0 – 11

Le fonctionnement cellulaire microbien dépend du maintien du pH intracellulaire approprié (pHi). Ainsi, plus le pH du milieu dans lequel se trouvent les cellules s'éloigne du pHi, plus les microorganismes se trouvent dans des conditions de stress défavorables à tout développement. Il faut cependant noter que les bactéries sont capables de maintenir un pHi plutôt constant, même si le pH extracellulaire fluctue. En effet, les membranes cellulaires ont une perméabilité sélective, permettant ainsi le passage d'ions et de composés spécifiques entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, ce qui assure un maintien du pH intracellulaire qui peut être très différent du pH externe (jusqu'à 2 unités de pH). Cependant, cette régulation est limitée dans le temps (179).

Le formulateur possède un large choix d'acides pour équilibrer le pH de ses formules. Il faut noter que les acides forts comme l'acide chlorhydrique ne jouent un rôle que sur le pH externe des cellules microbiennes alors que les acides faibles, plus lipophiles, sont capables de traverser la membrane cellulaire et d'agir sur le pH cytoplasmique.

Cependant, la majorité des produits cosmétiques ont un pH qui se situe entre 5 et 8. En dehors de certaines exceptions, il est donc difficile d'utiliser ce paramètre pour limiter la croissance

microbienne au sein du produit fini.

#### 3.4.2.4. Les alternatives naturelles :

- **Huiles essentielles :**

Les huiles essentielles sont utilisées depuis des centaines d'années pour leurs propriétés odorantes. Ces dernières années, leurs propriétés antimicrobiennes et antifongiques ont été le centre d'intérêt d'un grand nombre d'études (181).

*Rosmarinus officinalis*, *Lavandula officinalis*, *Artemisia afra*, *Thymus vulgaris*, *Eucalyptus globulus*, *Laurus nobilis*, *Salvia officinalis* et *Melaleuca alternifolia* sont les principales plantes utilisées aujourd'hui par les industriels de la cosmétique pour extraire des huiles essentielles substituant les conservateurs de synthèse. (182)

- **Définition des huiles essentielles :**

La Pharmacopée européenne décrit l'huile essentielle comme étant « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage ». (183)

Selon l'AFNOR, elle désigne un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des plantes contenant des citrals, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. (184)

La composition des huiles essentielles est très complexe, elles peuvent renfermer jusqu'à plusieurs centaines de molécules chimiques différentes. Les plus fréquemment rencontrés sont les alcools (phénols et sesquiterpénols), les cétones, les aldéhydes terpéniques, les esters, les éthers, les terpènes et les oxydes.

- **Labels et certifications :**

Une huile essentielle doit être certifiée par sa composition et son origine. En effet, une même plante peut fournir plusieurs huiles essentielles en fonction de l'organe utilisé. Ainsi par exemple, l'oranger amer (*Citrus aurantium*) est à l'origine de l'essence d'orange amère à partir du fruit, de l'essence de Néroli avec la fleur et de l'essence de petit grain bigaradier lors de l'hydrodistillation de la feuille, des ramilles et des petits fruits. (185)

Certains labels permettent de certifier l'origine botanique et géographique d'une plante, c'est le cas des huiles désignées par :

-Le label H.E.B.B.D ou **Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie**, créée par D.Baudoux pour *Pranarom*® (1991), signifie que l'huile essentielle possède un bulletin d'analyse établi avec le C.N.R.S. C'est un label de qualité des huiles essentielles.

-HECT ou **Huile Essentielle Chémotypée**, créée par P.Malhebiau (1984) pour certains laboratoires et marques comme *Phyosunaroms*®, gage de qualité des huiles essentielles sur le plan botanique et biochimique.

Certaines peuvent être issues de l'agriculture biologique, elles portent alors les labels suivant :

-Le label **BIO** garantit une huile essentielle d'origine biologique.

-Une huile essentielle possédant un label **ECOCERT** est une huile essentielle soumise au contrôle régulier d'un organisme de certification agréé par les pouvoirs publics.

-Le label A.B. correspondant à **Agriculture Biologique**, certifie que l'huile essentielle possède au minimum quatre-vingt quinze pour cent d'ingrédients issus de l'Agriculture Biologique, c'est-à-dire cultivée sans engrais, ni pesticides, et ne contenant pas d'O.G.M.



**Figure 26 :** Différents logos en place sur les flacons d'huiles essentielles certifiant leur qualité [W9][W10].

- **Mode d'action antibactérien des huiles essentielles :**

Les mécanismes par lesquels les huiles essentielles exercent leur activité antimicrobienne sont mal connus, du fait de la complexité de la composition chimique ; il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des huiles essentielles. Il est probable que leur activité antibactérienne ne découle pas d'un mécanisme unique, mais de plusieurs sites d'action au niveau cellulaire.

K Hulin *et al.* (1998) (186) rapportent que les huiles essentielles semblent posséder plusieurs modes d'action sur les différents microorganismes :

- ✓ Interférence avec la bicouche lipidique de la membrane cellulaire, provoquant une augmentation de la perméabilité et la perte des constituants cellulaires.
- ✓ Altération des différents systèmes enzymatiques dont ceux impliqués dans la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- ✓ Destruction ou inactivation du matériel génétique.

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large dû principalement à leur grande affinité aux lipides membranaires grâce à leur nature hydrophobe (187). Elles vont donc pouvoir inhiber la croissance des bactéries, des levures, ainsi que des moisissures.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est hautement dépendante de leur composition chimique, notamment de leurs constituants majeurs ; les composés chimiques

à plus grande efficacité et à large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol, eugenol), les alcools (α-terpinéol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et rarement les terpènes (104).

- **L'Alcool :**

L'alcool peut constituer une alternative aux conservateurs chimiques quand il est à faible concentration. À forte concentration, il est cependant asséchant et irritant pour les peaux sensibles tandis que, correctement dosé, il possède des effets antimicrobiens appréciables dans les produits cosmétiques.

L'avantage est que l'alcool est une substance naturelle qui peut parfois avoir une origine Biologique, elle pourra participer à la labellisation « bio » d'un produit.

L'alcool le plus fréquemment utilisé dans les produits cosmétiques pour ses qualités conservatrices est l'éthanol obtenu par :

- Fermentation du sucre extrait des végétaux (betterave, canne à sucre...)
- Hydrolyse de l'amidon contenu dans les céréales (blé, maïs...).

# Conclusion

## Conclusion :

Les parabens sont donc largement utilisés dans les domaines alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques pour leurs propriétés antifongiques et antibactériennes. Leur emploi est strictement réglementé au niveau Européen et les doses d'emploi sont fixées à 0,4% individuellement et à 0,8% en mélange. Pour vérifier cela, une méthode de dosage obligatoire a été éditée. Celle-ci repose sur une méthode HPLC en phase inverse et doit être précédée d'une identification par CCM.

Les parabens sont obtenus industriellement à partir du phénol, selon la réaction de Kolbe-Schmitt, puis par estérification avec l'alcool portant la chaîne alkyle voulue. Certaines études montrent qu'ils sont également trouvés à l'état naturel dans différents aliments et plantes ainsi que dans certaines espèces de bactéries, ce qui pourrait éventuellement, selon les auteurs, conduire à une voie d'obtention biosynthétique.

L'emploi des parabens depuis plus de 80 ans en tant que conservateur, leur toxicité relativement faible et leur hydrolyse rapide dans l'organisme en ont fait des substances reconnues comme sûres. Même si leur effet oestrogénisant est démontré, celui-ci reste considéré comme faible, aux doses d'emploi, comparé aux oestrogènes naturels tel que le 17- $\beta$ -estradiol.

La bioaccumulation des parabens dans les tissus sains n'a pu être démontrée. Darbre *et al.* ont, par contre, démontré leur présence dans les tissus cancéreux. Aucune étude n'a, à ce jour, pu démontrer une relation de cause à effet entre la présence de parabens et l'apparition d'une tumeur cancéreuse.

Comme pour toute substance, il existe des cas d'allergies aux parabens mais celles-ci sont bénignes et localisées. Depuis 1920 et malgré leur emploi massif dans les différents produits, seuls quelques cas spécifiques ont pu être rapportés à l'heure actuelle.

Les DJA, DL<sub>50</sub> et toutes les doses utilisées pour les études de toxicité sont largement supérieures aux doses d'exposition quotidiennes estimées. C'est pourquoi, au vu de leur rapport bénéfice/risque, aucune autorité n'a interdit leur utilisation, d'autant plus qu'aucun substitut présentant un spectre d'action aussi large, une aussi bonne stabilité et un risque moindre n'a été trouvé. La substitution des parabens n'est donc pas si simple.

Toutefois, le manque d'études récentes et la découverte, il y a peu, d'une possible bioaccumulation requière de nouvelles études plus larges et menées sur un plus long terme ...

# Références

- (1)- CASHMAN A.L., WARSHAW E. M. Structure, Allergenicity and Hormonal Properties, Dermatitis Parabens. Rev. Epidemiol.; 2005; 16: 57-66. 1ere paragraphe dans l'introduction.
- (2)- Dabre et Al 2004; Use of Underarm Cosmetic Products in Relation to Risk of Breast Cancer. 2eme paragraph dans l'introduction.
- (3)- DIRECTIVE 95/2/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 20 février 1995 concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants (JO no L 61 du 18. 3. 1995, p. 1). 2eme paragraph dans la définition.
- (4)- DORVAULT F., L'officine, Ed Visor 23<sup>ème</sup> édition, 1994, Evreux.
- (5)- LE COZ C.J., Ann Dermatol Venerol, 2004, 131, 309-310.
- (6)- Merck index encyclopédie des produits chimiques, de médicaments et de produits biologiques p 150.
- (7)- GOLDEN R., GANDY J., Letters to the editor, Journal of Applied Toxicology, 2004, 24, 297-298.
- (8)- SONI M.G., TAYLOR S.L., GREENBERG N.A., BURDOCK G.A.
- (9)- OPPENHEIMER, J., et al. Characterizing the passage of personal care products through wastewater treatment processes. Water Research, 2007, 79(13), p. 2564-2577.
- (10)- PETERSON, G., D. RASMUSSEN, and K. GUSTAVSON, Study on enhancing the endocrine disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals. 2007, DHI Water and Environment. p. 252.
- (11)- RADOVAN, C., et al. Electrochemical Sensing and Assessment of Parabens in Hydro- Alcoholic Solutions and Water Using a Boron-Doped Diamond Electrode. Sensors, 2008, 8(7), p. 4330- 4349.
- (12)- MARTINI M.C., SEILLER M., Actifs et additifs en cosmétologie, Ed Technique et documentation Lavoisier, Paris 2<sup>ème</sup> édition, 1999, 431 p , Paris.
- (13)- European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM). European Pharmacopoeia – State Of Work Of International Harmonisation. Pharmeuropa 2009; 21(1): 142–143. <http://www.edq-m.eu/site/-614.html> (accessed 3 February 2009).

(14)- RAYMOND CROWE ,PAUL J SHESKEYAND MARIEN EQUINN, HAND BOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS 6 emme edition. Ethylparaben. P270.

(15)- Z. Ali, V. U. Ahmad, M. Zahid, R. B. Tareen. Benzoic acid derivatives from *Stocksia brahuica*. *Phytochemistry*, 1998, 48, 7.

(16)- M.G. Soni, I.G. Carabin, G.A. Burdock. Safety assessment of esters of *p*-hydroxybenzoic acid (parabens) *Food andl Chemical Toxicol.*, 2005, 43, 985-1015.

(17)- ENGELBRECHTSZ, MARKOVIC Z. J. P., NATURFORSCH Z. Theoretical Study of the kolbe-Schmitt Mechanism. *Rev. Chem.*, 2002, 57: 812-818.

(18)- GROSA, DEL GROSSO, RUSSO R., ALLERGRONE G. Simultaneous stability indicating HPLC-DAD determination of Guaifenesin and Methyl and Propylparaben sin cough syrup. *J. Pharm. Biomed. An.*, 2006, 41 (3): 798-803.

(19)- LINDSEY A. S., JESKEY H., M.MOWAD J.C. Allergic contact dermatitis caused by paraben. *J. Amer. Dermatopath.*, 2000, 11: 53-55.

(20)- ZAHIDT T. M., ALI Z., AHMAD V.U. AND TAREEN R. B. Benzoic acid derivatives from *Stocksia Brahuica*. *J. Photochem.*, 1998, 48, (7): 1271-1273.

(21)- BAIS H. P., VEPACHEDU R., VIVANCO J. M. Root specific elicitation and exsudation of fluorescent b-carbolines in transformed root cultures of *Oxalis tuberosa*. *Plant. Physiol. Biochem.*, 2003, 41: 345-353.

(22)- PENG X., ADACHI K., CHEN. C., KASAI H., KANO H. K., SHIZURI Y., MISAWA N. Discovery of a Marine Bacterium Producing 4-hydroxybenzoate and its alkyl Esters, Parabens. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72, (8): 5556-5561.

(23)- EFSA, communiqué : l'EFSA émet un avis sur la sécurité d'utilisation des parabens dans les produits alimentaires, 29/09/04.

[http://www.efsa.eu.int/press\\_room/press\\_release/631\\_fr.html](http://www.efsa.eu.int/press_room/press_release/631_fr.html).

(24)- EUROPEAN COMMISSION, Scientific Committee on Consumer Products. SCCP/0873/05, Extended opinion on the safety of parabens, 28 janvier 2005.

(25)- ANSM. [en ligne]. Disponible sur : <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Medicaments-et-Parabenes-Point-d-information>. (2013).

(26)- Décret n°2008-436 du 6 mai 2008 - art. 2. Article R5121-1 du code de la santé publique français modifié.

(27)- "Butylparaben Review of Toxicological Literature" (PDF). National Toxicological Program. April 2005. Archived (PDF) from the original on 2011-10-21.

(28)- Geis, Philip A. (2006). "Preservation strategies". In Geis, Philip A. (ed.). *Cosmetic Microbiology*. CRC Press. pp. 163–180. doi:10.3109/9781420003321-12. ISBN 978-0-8493-1453-7.

(29)- "Parabens". Vashon Organics. Archived from the original on 2012-04-25. Retrieved 2011-10-31.

(30)- "Parabens as Preservatives" (PDF). UENO FINE CHEMICALS INDUSTRY LTD. Archived from the original (PDF) on 2012-04-25. Retrieved 2011-10-31.

(31)- Jump up to:<sup>a b c</sup> "Parabens". U.S. Food and Drug Administration. Archived from the original on 2011-10-30. Retrieved 2011-10-31.

(32)- "Ibuprofen Suspension". FreshPatents.com. Retrieved 2011-10-31.<sup>[permanent dead link]</sup>

(33)- Methylparaben Experimental Properties". PubChem.

(34)- Gu W, Xie DJ, Hour XW (2009). "Toxicity and Estrogen Effects of Methyl Paraben on *Drosophila melanogaster*". *Food Science*. 30(1): 252–254.

(35)-Sun L, Yu T, Guo J, Zhang Z, Hu Y, Xiao X, et al. (April 2016). "The estrogenicity of methylparaben and ethylparaben at doses close to the acceptable daily intake in immature Sprague-Dawley rats". *Scientific Reports*. 6: 25173. Bibcode:2016NatSR...625173S. doi:10.1038/srep25173. PMC 4848538. PMID 27121550.

(36)- Oishi (2002). "Effects of propyl paraben on the male reproductive system". *Food and Chemical Toxicology*. 40 (12): 1807–13. doi:10.1016/s0278-6915(02)00204-1. PMID 12419695.

(37)- Directorate-General for Consumer Safety, European Union (2011). "Scientific Committee on Consumer Safety Opinion on Parabens COLIPA n° P82" (PDF). Retrieved December 15, 2017.

(38)-Ethyl paraben, thegoodscentscompany.com

(39)-SABALITSCHKA, T. (1930). Application of ethyl p-hydroxybenzoate in maintenance of sterility, in sterilization and in disinfection. Arch. Pharm. 268, 653-73.

(40)- SONI M.G, CARABIN I.G., BURDOCK G.A., Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens), Food and Chemical Toxicology, 2005, 43 (7), 985-1015.

(41)- CREMIEUX A., FLEURETTE J., FOURTILLAN J.B., JOLY B., SOUSSY C.J., Les antiseptiques, Ed Sarget, 1980.

(42)- NGUYEN T., CLARE B., GUO W., MARTINAC B., The effects of parabens on the mechanosensitive channels of *E. coli*, Eur. Biophys. J., 2005, 34(5), 385-95.

(43)- BREDIN J., DAVIN-REGLI A., PAGES J.M., Propylparaben induces potassium efflux in *Escherichia coli*, J. Antimicrob. Chemother., 2005, 55(6), 1013-15.

(44)- MCVAY L.V., SPRUNT D.H., Moniliasis in aureomycin therapy, Society for Experimental Biology and Medecine, 1951, 78, 759-761.

(45)- AALTO, T.R., FIRMAN, MC., and RIGLER, N.E. (1953). p-Hydroxybenzoic acid ester as a preservative. 1. Utilization, bactericidal and fungicidal investigations, properties, and determination. 1. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 42(8), 449-57.

(46)- ROSEN, W.E., and BERKE, P.A. (1973). Modern concepts of cosmetic preservation. J. Sot. Cos. Chem. 24, 663-75.

(33)- M. Bomar. Estimation of efficiency of fungi toxic compounds according to the inhibition of the mycelium growth. Folia Microbiologica, 1962, 7, 185-190.

(47)- NEIDIG, C.P., and BURRELL, H. (1944). The esters of p-hydroxybenzene acid as preservatives. Drug Cosmet. Ind. 54(4), 408-10, 481-9.

(48)- SOKOL, H. (1952). Recent developments in the preservation of pharmaceuticals. Drug Standards 20(5-6), 89- 106.

(49)- SHIRALKAR, N.D., MANJREKAR, S.P., and RECE, D.V. (1976). Some antimicrobial properties of p-hydroxybenzoates (parabens). Indian Food Packer 30(4), 22-7.

- (50)- BOCOBO, F.C., COLEMAN, M.E., HARRELL, R., and CURTIS, AC. (1956). In vitro activity of p-hydroxybenzoic acid esters on pathogenic fungi. *J. Invest. Dermatol.* 26(4), 239-42.
- (51)- WOLF, F.T. (1950). Inhibition of pathogenic fungi in vitro by methyl p-hydroxybenzoate. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 5, 117-9.
- (52)- GILLILAND D., PO A.L.W., SCOTT E., Kinetic evaluation of claimed synergistic paraben combinations using a factorial design, *Journal of Applied Bacteriology*, 1992, 72, 258-261.
- (53)- DARWISH R., BLOOMFIELD S.F., The effect of co-solvents on the antibacterial activity of paraben preservatives, *Int. J. Pharm.*, 1995, 119, 183- 192.
- (54)- DARWISH R., The effect of co-solvents on the activity of preservatives in oral aqueous dosage forms, Ph. D Thesis, University of London, 1992.
- (55)- LE COZ C.J., *Ann Dermatol Venerol*, 2004, 131, 309-310.
- (56)- DUNN K., LUTZ P., Prevention and cure, *Soap, perfumery & cosmetics*, sept. 2003, 36.
- (57)- SCOGS, Select Committee on GRAS Substances, Food ingredients methyl- and propylparaben, NTIS PB221 209, 1972.
- (58)- SONI M.G, CARABIN I.G., BURDOCK G.A., Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens), *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43 (7), 985-1015.
- (59)- DARBRE P.D., ALJARRAH A., MILLER W.R., COLDHAM N.G., SAUER M.J, POPE G.S., Concentrations of parabens in human breast tumours, *J. Applied Toxicol.*, 2004, 24, 5-13.
- (60)- ROUSSELLE C., Département d'évaluation des produits cosmétiques, biocides et de tatouages, bulletin n° 30 de l'AFFSaPS de décembre 2005.
- (61)- BANDO H., MOHRI S., YAMASHITA F., TAKAKURA Y., HASHIDA M., Effects of metabolism on percutaneous penetration of lipophilic drugs, *J. Pharm. Sci.*, 1997, 86, 759-761.

- (62)- JUN H.W., MAYER R.T., HIMEL C.M., LUZZI L.A., Binding study of p-hydroxybenzoic acid esters to bovine serum albumin by fluorescent probe technique, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1971, 60, 1821-1825.
- (63)- ANDERSON F., Final report on the safety assessment of isobutylparaben and isopropylparaben. Safety assessment of cosmetic ingredients: twentyseventh report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, *J. Am. Coll. Toxicol.*, 1995, 14, 365-372.
- (64)- SONI M.G., TAYLOR S.L., GREENBERG N.A., BURDOCK G.A., Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature, *Food and chemical Toxicology*, 2002, 40, 1335-1373.
- (65)- GOLDEN R., GANDY J., VOLLMER G., A Review of the Endocrine Activity of Parabens and Implications for Potential Risks to Human Health, *Critical Reviews in Toxicology*, 2005, 35, 435-458.
- (66)- ELDER R.L., Final Report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben, *Journal of the American College of Toxicology*, 1984, 3 (5), 147-209.
- (67)- NAKAZAWA H., ODA H., FUJISIMA H., TSUKIOTA T., TERASAWAJ., Analysis of chlorobenzenes, para-hydroxybenzoic acid esters and herbicides in human subjects using GC/MS, A report of the Research Fund of Health and Welfare of Japan, Ministry of Health and Welfare of Japan, Tokyo, 1999, 1-6.
- (68)- GAZIN V., Unité veille toxicologique et évaluation non clinique, bulletin n° 22 de vigilance de l'AFSSaPS de juillet/août 2004.
- (69)- GAZIN V., Unité veille toxicologique et évaluation non clinique, bulletin n° 27 de vigilance de l'AFSSaPS de juin 2005.
- (70)- GOLDEN R., GANDY J., VOLLMER G., A Review of the Endocrine Activity of Parabens and Implications for Potential Risks to Human Health, *Critical Reviews in Toxicology*, 2005, 35, 435-458.
- (71)- EUROPEAN COMMISSION, Scientific Committee on Consumer Products SCCP/0873/05, Extended opinion on the safety evaluation of parabens, 28 janv 2005.

- (72)- TASUKAMOTO H., TERADA S., Metabolism of drugs XLVII. Metabolic fate of para-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbits, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1964, 12, 765-769.
- (73)- INSERM, Reproduction et Environnement. 2011, INSERM. p. 43.
- (74)- MATTHEWS C., DAVIDSON J., BAUER E., MORRISON J.L., RICHARDSON A.P., p-hydroxybenzoic acid esters as preservatives II. Acute and chronic toxicity in dogs, rats and mice, Journal of the American Pharmaceutical Association, 1956, 45, 260-267
- (75)- MULBERRY G.K., ENTRUP M.R., AGIN J.R., Cosmetics and Toiletries, Hill Top biolabs Inc., Cincinnati, 1987, 102
- (76)- ELDER, R.L. Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. Journal of the American College of Toxicology, 1984, 3, p. 147-209.
- (77)- SADO, I. Synergistic toxicity of official permissible preservative food additives. Japanese Journal of Hygiene, 1973, 28.
- (78)- INAI, K., et al. Tumorigenicity study of butyl and isobutyl p-hydroxybenzoates administered orally to mice. Food and Chemical Toxicology, 1985, 23, p. 575-578.
- (79)- HOBERMAN, A.M., et al. Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 2008, 83(2), p. 123-133.
- (80)- OISHI, S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. Toxicology and Industrial Health, 2001, 17(1), p. 31-39.
- (81)- BARSE, A., et al. Vitellogenin Induction and Histo-metabolic Changes Following Exposure of Cyprinus carpio to Methyl Paraben. Asian-Australasian Association of Animal Production Societies, 2010, 23(12), p. 1557-1565.
- (82)- GAZIN V., Unité veille toxicologique et évaluation non clinique, bulletin n° 20 de vigilance de l'AFSSaPS d'avril 2004
- (83)- MASON M.M., CATE C.C., BAKER J., Toxicology and carcinogenesis of various chemicals used in the preparations of vaccines, Clinical Toxicology, 1971, 4, 185-204

- (84)- HOMBERGER F., Carcinogenicity of several compounds National Technical Information Service PB N° 183 027, 1968, 1-26
- (85)- MATSUOKA A., HAYASHI M., ISHIDATE M., Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S-9 mix *in vitro*, Mutation Researche, 1979, 66(3), 277-290
- (86)- INAI K., AOKI Y., AKAMIZU H., ETO R., NISHIDA T., TOKUOKA S., Tumorigenicity study of butyl and isobutyl p-hydroxybenzoates administrated orally to mice, Food and Chemical Toxicology, 1985, 23, 575-578
- (87)- MATSUOKA A., HAYASHI M., ISHIDATE M., Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S-9 mix *in vitro*, Mutation Researche, 1979, 66(3), 277-290
- (88)- EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a Request from the Commission related to para hydroxybenzoates (E214-219). The EFSA Journal, 2004, 83, p. 1-26.
- (89)- TAYAMA, S., Y. NAKAGAWA, and K. TAYAMA. Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2008, 649(1-2), p. 114-125.
- (90)- SHAW, J. and D. DECATANZARO. Estrogenicity of parabens revisited: Impact of parabens on early pregnancy and an uterotrophic assay in mice. Reproductive Toxicology, 2009, 28(1), p.26-31.
- (91)- ROUTLEDGE, E.J., et al. Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. Toxicology and Applied Pharmacology, 1998, 153(1), p. 12-19.
- (92)- DAGHER, Z., et al. p-Hydroxybenzoate esters metabolism in MCF7 breast cancer cells. Food and Chemical Toxicology, (0).
- (93)- KHANAL, T., et al. Protective role of metabolism by intestinal microflora in butyl paraben- induced toxicity in HepG2 cell cultures. Toxicology Letters, 2012, 213(2), p. 174-183.
- (94)- INSERM ; Reproduction et environnement (2011). chap 60 , Parabens :Etudes structure-fonction.études *in silico* parabens.Études .
- Disponible sur [http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/Chapitre\\_60.html](http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/Chapitre_60.html)

(95)- V. Gazin. Unité veille toxicologique et évaluation non clinique. Bulletin n°20 de vigilance de l'AFSSaPS d'avril 2004.

(96)- P. W. Harvey, P. Darbre. Endocrine disrupters and human health : could œstrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women ? J. Appl. Toxicol., 2004, 24, 167-176.

(97)- Darbre PD et al :«Estrogenic activity of benzylparaben»; J ApplToxicol; 2003; 23, 43-51.

(98)- Pugazhendhi D, Sadler AJ, Darbre PD. «Comparison of the global gene expression profiles produced by methylparaben, n-butylparaben and 17beta- œstradiol in MCF7 human breast cancer cells» ;J ApplToxicol ;2007; 27,67-77.

(99)- Van Meeuwen JA et al : «Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics» Toxicol Appl Pharmacol ;2008; 230 , 372-382.

(100)- Sadler. AJ, Pugazhendhi.D, Darbre .PD:«Use of global gene expression patterns in mechanistic studies of œstrogen action in MCF7 human breast cancer cells»; Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology ; 2009; 114 , 21-32.

(101)- Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, Kano I : «ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER alpha and PR»; Food ChemToxicol ;2001 ;39 ,1225- 1232.

(102)- Byford JR et al : «Estrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells.» ; J Steroid BiochemMolBiol; 2002; 80, 49-60.

(103)- Terasaka S , Inoue A , Tanji M , Kiyama R. : «Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bis- and benzoylphenols for evaluation of estrogenic activity» ;ToxicolLett ;2006 ;163 ,130-141.

(104)- Blair . RM et al : «The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands» ;ToxicolSci; 2000 ;54 ,138-153.

- (105)- E. J. Routledge, J. Parker, J. Odum, J. Ashby, J. P. Sumpter. Some alkylhydroxybenzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1998, 153 (1), 12-19.
- (106)- Prusakiewicz JJ et al: « Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects ». *Toxicology* 2007 ;232,248,-256.
- (107)- Hossaini A , Larsen J J, Larsen .J C: «Lack of oestrogenic effects of food preservatives (parabens) in uterotrophic assays»; *Food and Chemical Toxicology*; 2000; 38 (4) ,319-323.
- (108)- Routledge E J ,Parker J, Odum J ,Ashby. J, Sumpter. J P :«Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic.» ;*Toxicology and applied pharmacology*; 1998 ;153( 1), 12-19.
- (109)- Darbre P D et al: «Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo »;*J. Appl. Toxicol* ;2002; 22,219–226.
- (110)- SatohK, Nonaka R, Ohyama K I , Nagai F :«Androgenic and antiandrogenic effects of alkylphenols and parabens assessed using the reporter gene assay with stably transfected CHO-K1 cells (AR-EcoScreen System)». *Journal of health science*; 2005; 51( 5), 557-568.
- (111)- Chen J et al : «Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products.» ;*Toxicology and applied pharmacology* ;2007; 221( 3); 278-284.
- (112)- Kolsek K, Gobec M, Rascan I M , Dolenc M S: «Screening of bisphenol A, triclosan and paraben analogues as modulators of the glucocorticoid and androgen receptor activities» ;*Toxicology in Vitro*; 2015 ;29 (1),8-15.
- (113)- Meeker J D, Yang T, Ye X, Calafat A M , Hauser R: «Urinary Concentrations of Parabens and Serum Hormone Levels, Semen Quality Parameters, and Sperm DNA Damage.»; *Environ Health Perspect*; 2010; 119(2).
- (114)- Oishi S: «Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats.»; *Food and chemical toxicology*; 2004; 42(11), 1845-1849.

- (115)- Hoberman A M et al : «Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats.». *Developmental and Reproductive Toxicology*; 2008; 83(2) ; 123-133.
- (116)- Oishi S.: «Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice»; *Arch Toxicol* ;2002 ;76 ,423-129.
- (117)- Oishi S «Effects of propyl paraben on the male reproductive system» ;*Food and Chemical Toxicology*; 2002; 40( 12) ,1807-1813.
- (118)- Oishi.S; «Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats» ;*ToxicolInd Health* ;2000;17,31–39.
- (119)- P. D. Darbre, G. S. Pope, A. Aljarrah, W. R. Miller, N. G. Coldham, M. J. Sauer. Reply to Robert Golden and Jay Gandy. *J. Appl. Toxicol.*, 2004, 24, 299-306.
- (120)- P. W. Harvey, P. Darbre. Endocrine disrupters and human health : could œstrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women ? *J. Appl. Toxicol.*, 2004, 24, 167-176.
- (121)- Pugazhendhi D, Sadler AJ, Darbre PD. «Comparison of the global gene expression profiles produced by methylparaben, n-butylparaben and 17beta- œstradiol in MCF7 human breast cancer cells» ;*J ApplToxicol* ;2007; 27,67-77.
- (122)- Byford JR et al : «Estrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells.» ; *J Steroid BiochemMolBiol*; 2002; 80, 49-60.
- (123)- Barr L et al ;«Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum»; *Journal of Applied Toxicology* ;2012; 32( 3) , 219-232.
- (124)- Harvey.PW, Everett .DJ. : «Parabens detection in different zones of the human breast: consideration of source and implications of findings.»; *J ApplToxicol.*; 2012;32(5) ,305-9.
- (125)- ROWLINGSON, J.C. Toxicology of local anesthetic additives. *Regulatory Anesthesiology*, 1993, 18.

- (126)- MIZUNO, K., S. OGAWA, and S. ITOH. Suppressive effect of methyl paraben on the evoked compound action potentials in excised rabbit cervical vagus nerve. *Matsui*, 1994, 43, p. 1008- 1014.
- (127)- KAWAGUCHI, M., et al. Maternal isobutyl-paraben exposure alters anxiety and passive avoidance test performance in adult male rats. *Neuroscience Research*, 2009, 65(2), p. 136-140.
- (128)- ALI, E.H.A. and A.H.M. ELGOLY. Combined prenatal and postnatal butyl paraben exposure produces autism-like symptoms in offspring: Comparison with valproic acid autistic model. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2013, 111(0), p. 102-110.
- (129)- Nishizawa C et al :« Reaction of para-hydroxybenzoic acid esters with singlet oxygen in the presence of glutathione produces glutathione conjugates of hydroquinone, potent inducers of oxidative stress» ; *Free radical research*; 2006; 40 (3), 233-240.
- (130)- Okamoto Y, Hayashi T, Matsunami S, Ueda K, Kojima N : «Combined activation of methylparaben by light irradiation and esterase metabolism toward oxidative DNA damage» *Chem Res Toxicol*;2008 ;21(8) ,1594-9.
- (131)- Handa O et al :«Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes.» *Toxicology*; 2006; 227( 1), 62-72.
- (132)- Ishiwatari S et al : «Effects of methyl paraben on skin keratinocytes.» ; *Journal of Applied Toxicology*; 2007 ;27 (1) , 1-9.
- (133)- SONI M.G, CARABIN I.G., BURDOCK G.A., Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens), *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43 (7), 985-1015.
- (134)- SONI M.G., TAYLOR S.L., GREENBERG N.A., BURDOCK G.A., Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature, *Food and chemical Toxicology*, 2002, 40, 1335-1373.
- (135)- F.B., *Parfums Cosmétiques Actualités*, 1996, 130, 49-54.
- (136)- SMOLINSKE S., *Handbook of food, drug and cosmetic excipients*, CRC Press, 1992.
- (137)- CLOSE J.A., NEILSEN P.A., Resistance of a strain of *Pseudomonas cepacia* to esters of p-hydroxybenzoic acid, *Applied Environmental Microbiology*, 31, 718-722.

(138)- VALKOVA N., LEPINE F., VALEANU L., DUPONT M., LABRIE L., BISAILLON J.G., BEAUDET R., SHARECK F., VILLEMUR R., Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM, *Applied Environmental Microbiology*, 2001, 67, 2404-2409.

(139)- THIERS H., *Les cosmétiques*, Ed Masson, 1980, 334 p, Paris.

(140)- MARTINI M.C., SEILLER M., *Actifs et additifs en cosmétologie*, Ed Technique et documentation Lavoisier, Paris 2<sup>ème</sup> édition, 1999, 431 p, Paris.

(141)- ALI Z., AHMAD V.U., ZAHID. M., TAREEN R.B., Benzoic acid derivatives from *Stocksia brahuica*, *Phytochemistry*, 1998, 48, 7.

(142)- SAKAMOTO T., YANAGI M., MITSUI T., Effect of some cosmetic pigments on the bactericidal activities of preservatives, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1982, 33(4), 220.

(143)- SOULIOTI A.M.A., WOODS N.M., COBBOLD P.H., ROGER I.W., Preservatives in the vehicle of naloxone: pharmacological effects, *Biomed. Pharmacother.*, 1989, 43, 771.

(144)- LABAT L, KUMMER E., DUBOST J., *J. Pharm. Biomed. Anal*, 2000, 23, 763.

(145)- KOROTKOVA E.I., AVRAMCHIK O.A., ANGELOV T.M., KARBEINOV Y.A., Investigation of antioxidant activity and lipophilicity parameters of some preservatives, *Electrochimica Acta*, 2005, 51, 324-332.

(146)- NATHAN P.W., SEARS T.A., Action of methylhydroxybenzoate on nervous conduction, *Nature (London)*, 1961, 192, 668.

(147)- XIANG J., ZHELONG X., HUGH E., CRISWELL G., BOYSEN, Propylparaben inhibits voltage-dependant sodium channels and protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury, *Life Sciences*, 2004, 74 (24), 3043-3052.

(148)- DORON S., FRIEDMAN M., FALACH M., SADOVNIC E., ZVIA H., Antibacterial effect of parabens against planktonic and biofilm *Streptococcus sobrinus*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2001, 18(6), 575-578.

(145)- KOROTKOVA E.I., AVRAMCHIK O.A., ANGELOV T.M., KARBEINOV Y.A., Investigation of antioxidant activity and lipophilicity parameters of some preservatives, *Electrochimica Acta*, 2005, 51, 324-332.

- (149)- DINGLEY A.L., HOLMQUIST B., VALLEE B.L., Narcain inhibition of human liver alcohol deshydrogenase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1985, 131, 299-306.
- (150)- GEDDES B.A., LEFCOE N.M., Respiratory smooth muscle relaxing effect of commercial steroid preparations, *American Reviews of Respiratory Disorders*, 1973, 107, 3959.
- (151)- A. G. Rumley, and J. R. Paterson, *Ann. Clin. Biochem.* 35, 181 (1998).
- (152)- A. T. Diplock, *Anal. Proc.* 27 , 223 (1990).
- (153)- M. Streek, *Parfuem. Kosmet.* 71, 136 (1990).
- (154)- H. Koenig, and E. Walldorf , *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 335, 216 (1989).
- (155)- C. Ho, and G. L. Chen, *Yaowu. Shipin. Fenxi.* 5, 1 (1997). (Through Internet: <http://legend.kacst.edu.sa/cgi-bin/webspirs.cgi>).
- (156)- ICH Q6A. NTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE ,16-100136-12.
- (157)- *European Pharmacopoeia* 3 ed., Council of Europe, Strasbourg . (2001).
- (158)- BURGOT G., BURGOT J. L. *Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. Méthodes instrumentales d`analyse chimique et d`application*, Paris, 2011, 3<sup>e</sup> édition.
- (159)- A. B. Prevot, E. Pramauro, M. Gallarate, M. E. Carlotti, and G. Orio, *Anal. Chim. Acta.* 412 , 141 (2001).
- (160)- Y. J. Heo, and K. J. Lee, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17, 1371 (1998).
- (161)- <https://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/HPLC/HPLC.php>
- (162)- A. Shabir, *J. Pharm.. Biomed. AnaL.* 34 ,207 (2004).
- (163)- R. Hajkova, P. Solich, J. Dvorak and J. Sicha *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 , 912 (2003).
- (164)- R. Hajkova, P. Solich, J Dvorak and J. Sicha *Anal. Chim. Acta.* 467 , 91 (2002).

- (165)- E. Koundourellis, E.T. Malliou, and T.A.Broussali, J. Pharm. Biomed. Anal. 23 , 469 (2000).
- (166)-« planar chromatography [archive] », Compendium of Chemical Terminology [« Gold Book »], IUPAC, 1997, version corrigée en ligne : (2006-), 2<sup>e</sup> éd.)
- (167)- ROUESSAC F. et ROUESSAC A. Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod, Paris, 2000, 5<sup>e</sup> édit. : 56-75 ; 430.
- (168)- Skoog, et. al., Principles of Instrumental Analysis, 6th ed., Thomson Brooks/Cole, 2007, 169-173.
- (169)-EMA. Excipients in the label and package leaflet of medicinal products for human use. [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general\\_content\\_000359.jsp&mid=WC0b01ac0580028e8e](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000359.jsp&mid=WC0b01ac0580028e8e), consulté le 18 octobre 2014.
- (170)- EMA. Reflection paper on the use of methyl- and propylparaben 5 as excipients in human medicinal products for oral use. 25 April 2013.
- (171)-Afssaps. Questions/Réponses : Parabènes et médicaments. 25 mai 2011.
- (172)- Académie Nationale de Pharmacie. Parabènes & médicaments : un problème de santé publique ?. 22 mai 2013.
- (173)-Etude d'association. Charnock C., Finsrud T., Combining esters of para-hydroxy benzoic acid (parabens) to achieve increased antimicrobial activity. J Clin Pharm Ther. 2007; 32 (6):567-72)
- (174)-Prickett P.-S., Yang T., Ye X., Calafat A.-M., Hauser R., Potentiation of preservatives (parabens) in pharmaceutical formulations by low concentrations of propylene glycol. J Pharm Sci ; 1961; 50 : 316-20.
- (175)-Laboratoires THEA. La révolution du sans conservateur. [http://www.laboratoires-thea.com/RECHERCHE-INNOVATION/Domaines-d-expertise/file.indexdetails.file/menu\\_id.154/](http://www.laboratoires-thea.com/RECHERCHE-INNOVATION/Domaines-d-expertise/file.indexdetails.file/menu_id.154/), consulté le 25 novembre 2013.
- (176)- Kabara J.J , Orth D.S. : «Preservative-free and selfpreserving cosmetics and drugs» ;Cosmet. Toiletries; 1998; 113; 51–58.
- (177)-Varvaresou A, Papageorgiou S, Tsirivas E, Protopapa E, Kintziou H, Kefala V: «Self-

preserving cosmetics» ; Int. J. Cosmetic Science ; 2009 ; 31; 163–175.

(178)- Lopez D: « Cosmetic product sterilization » ; 2007 ; WO 2007/148022 A2.

(179)- Kerdudo A ; Optimisation de la conservation des cosmétiques: impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels,encapsulation ;Thèse de Doctorat ,Nice ; 2014

(180)- Berthele H , Sella O, Lavarde M , Mielcarek C, Pense-Lheritier A-M ,Pirnay S : «Determination of the influence of factors (ethanol, pH and aw) on the preservation of cosmetics using experimental design»; Int. J. Cosm. Sci.; 2014 ; 36 ; 54–61

(181)- Fernandez X, Chemat F. : Les huiles essentielles – Vertus etApplications ; Ed. Vuibert, 2012.

(182)-Papageorggiou S ,Varvaresou A , Tsirivas E, Demetzos C.:«New alternatives to cosmetics preservation» ; Journal of Cosmetic Science ; March/April 2010 ; 61; 107–123.

(183)-Pharmacopée européenne ;Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. ;Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (Afssaps) ; Mai 2008.

(184)-Paris M , Hurabielle M ; Abrégé de matière médicale. ; Pharmacognosie, Tome I ;édition Masson ; 1981.

(185)-Bruneton J ; Pharmacognosie – Phytochimie - Plantes médicinales ; Ed. TEC&DOC ; Paris ; 2009.

(186)-Hulin V., Mathot A.G., Mafart P., Dufossé L. : «Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'aromes» Sciences des aliments ; 1998 ; 18 ; 563-582.

(187)-Dorman H.J.D, Deans H.J.D. « Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils» ; Journal of Applied Microbiology. 2000 ;88 (2) ;308–316,

#### **Webographie :**

[W1]- Fiacre J.L., 2014. Reformulation cosmétique : bilan, Disponible sur <http://www.cosmepar.fr/reformulation-cosmetique-bilan>.

[W2]- Structure chimique du Methylisothiazolinone. disponible sur :

<https://en.wikipedia.org/wiki/Methylisothiazolinone>

[W3]- SFD .Communiqué de presse Allergie de contact et conservateurs ; Paris, le 23 octobre 2014. disponible sur : <http://www.sfdermato.org/>

[W4]- European Commission - Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS).« Opinion on Methylisothiazolinone» (P94) 2013. disponible sur :[http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/index_en.htm)

[W5]- Structure chimique duPhenoxyethanol. disponible sur :

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2-phenoxyethanol-Line-Structure.svg>

[W6]- ANSM ; Evaluation du risque lié a l'utilisation du phénoxyéthanol dans les produits cosmetiques ; Mai 2012 ;41 .Disponible sur : [www.ansm.sante.fr](http://www.ansm.sante.fr)

[W7]- Monodoses stériles de démaquillant yeux Toleriane de Roche- Posay.Disponible sur : <http://www.laroche-posay.fr>

[W8]- Innovation packaging 100 % hermétique . Disponible sur : [www.laroche-posay.fr](http://www.laroche-posay.fr)

[W9]- Huiles essentielles Phytosun . disponible sur : [www.phytosunaroms.com](http://www.phytosunaroms.com)

[W10]- Procédé d'obtention des huiles essentielles Pranarôm .disponible sur : [www.pranarom.com](http://www.pranarom.com)

[W11]- [https://www.lemonde.fr/planete/article/2011/05/23/des-parabenes-presents-dans-400-medicaments\\_1525948\\_3244.html](https://www.lemonde.fr/planete/article/2011/05/23/des-parabenes-presents-dans-400-medicaments_1525948_3244.html)

## Résumé:

Les parabènes sont des produits chimiques naturels ou synthétiques qui sont ajoutés à divers **produits cosmétiques et pharmaceutiques** principalement sous forme de **préparations liquides** qui aident à prévenir la décomposition microbienne. En effet ils sont les conservateurs les plus employés, du fait de leur large spectre d'activité **antimicrobienne et antifongique**; et de leur bonne tolérance, hormis une hypersensibilité induite par leur application sur une peau lésée ou réactive. Pourtant, les parabènes sont au centre de **polémiques** portant sur leur potentiel œstrogénique, leur **toxicité** sur les paramètres de reproduction mâle et la découverte de ces molécules dans des biopsies de tumeurs du sein. D'après l'analyse des publications scientifiques actuelles et avis publiés par les autorités de santé, les parabènes sont à ce jour des **conservateurs controversés**. Dans ce contexte, de nouvelles alternatives en termes de conservation voient ainsi le jour : des alternatives physiques avec de nouveaux packagings et des alternatives chimiques avec des conservateurs retrouvés à l'état naturel.

**Mots clé:** parabènes, conservateurs, antimicrobienne, antifongique, produits pharmaceutiques, préparations liquides, cosmétiques, toxicité, polémique, alternatives

## ABSTRACT:

Parabènes are natural or synthetic chemicals that are added to various cosmetic and pharmaceutical products primarily in the form of liquid preparations that help prevent microbial breakdown. Indeed they are the most used preservatives, because of their broad spectrum of antimicrobial and anti fungal activity; and their good tolerance, except for hypersensitivity induced by their application on injured or reactive skin. However, parabens are at the center of controversies concerning their estrogenic potential, their toxicity on male reproduction parameters and the discovery of these molecules in biopsies of breast tumors. According to an analysis of current scientific publications and opinions published by health authorities, parabènes are to date controversial preservatives. In this context, new alternatives in terms of conservation are emerging: physical alternatives with new packaging and chemical alternatives with preservatives found in their natural state.

**Keywords:** parabens, preservatives, antimicrobial, antifungal, pharmaceuticals, liquid preparations, cosmetics, toxicity, controversy, alternatives

### المخلص :

البارابين هو مواد كيميائية طبيعية أو اصطناعية تضاف إلى العديد من مستحضرات التجميل والأدوية في المقام الأول في شكل مستحضرات سائلة تساعد على منع التحلل الميكروبي. في الواقع هم المواد الحافظة الأكثر استخدامًا ، بسبب مجالهم الواسع من النشاط المضاد للميكروبات والفطريات ؛ وتحملها الجيد ، باستثناء فرط الحساسية الناجم عن تطبيقها على الجلد المصاب أو التفاعلي. ومع ذلك ، فإن البارابين هو في مركز الجدل حول إمكانات هرمون الاستروجين ، وسمية على معلمات تكاثر الذكور واكتشاف هذه الجزيئات في خزعات أورام الثدي. وفقًا لتحليل المنشورات والآراء العلمية الحالية التي نشرتها السلطات الصحية ، فإن البارابين حتى الآن مواد حافظة مثيرة للجدل. في هذا السياق ، تظهر بدائل جديدة من حيث الحفظ: البدائل المادية مع العبوات الجديدة والبدائل الكيميائية مع المواد الحافظة الموجودة في حالتها الطبيعية.

الكلمات الرئيسية: البارابين ، والمواد الحافظة ، ومضادات الميكروبات ، والفطريات ، والأدوية ، والمستحضرات السائلة ، ومستحضرات التجميل ، والسمية ، والجدل ، والبدائل

<b>SAIDANI Oussama</b> <a href="mailto:Oussamasaidani98@gmail.com">Oussamasaidani98@gmail.com</a>	<b>ZERROUK Abderrezak</b> <a href="mailto:abderrezak.zerrouk20@gmail.com">abderrezak.zerrouk20@gmail.com</a>	<b>BELMOKHTAR Oussama</b> <a href="mailto:oussamabelmokhtar04@gmail.com">oussamabelmokhtar04@gmail.com</a>
--	---	---

### Résumé:

Les parabènes sont des produits chimiques naturels ou synthétiques qui sont ajoutés à divers **produits cosmétiques et pharmaceutiques** principalement sous forme de **préparations liquides** qui aident à prévenir la décomposition microbienne. En effet ils sont les conservateurs les plus employés, du fait de leur large spectre d'activité **antimicrobienne et antifongique**; et de leur bonne tolérance, hormis une hypersensibilité induite par leur application sur une peau lésée ou réactive. Pourtant, les parabènes sont au centre de **polémiques** portant sur leur potentiel œstrogénique, leur **toxicité** sur les paramètres de reproduction mâle et la découverte de ces molécules dans des biopsies de tumeurs du sein. D'après l'analyse des publications scientifiques actuelles et avis publiés par les autorités de santé, les parabènes sont à ce jour des **conservateurs controversés**. Dans ce contexte, de nouvelles alternatives en termes de conservation voient ainsi le jour : des alternatives physiques avec de nouveaux packagings et des alternatives chimiques avec des conservateurs retrouvés à l'état naturel.

**Mots clé:** parabènes, conservateurs, antimicrobienne, antifongique, produits pharmaceutiques, préparations liquides, cosmétiques, toxicité, polémique, alternatives

### ABSTRACT:

Parabens are natural or synthetic chemicals that are added to various cosmetic and pharmaceutical products primarily in the form of liquid preparations that help prevent microbial breakdown. Indeed they are the most used preservatives, because of their broad spectrum of antimicrobial and anti fungal activity; and their good tolerance, except for hypersensitivity induced by their application on injured or reactive skin. However, parabens are at the center of controversies concerning their estrogenic potential, their toxicity on male reproduction parameters and the discovery of these molecules in biopsies of breast tumors.

According to an analysis of current scientific publications and opinions published by health authorities, parabènes are to date controversial preservatives. In this context, new alternatives in terms of conservation are emerging: physical alternatives with new packaging and chemical alternatives with preservatives found in their natural state.

**Keywords:** parabens, preservatives, antimicrobial, antifungal, pharmaceuticals, liquid preparations, cosmetics, toxicity, controversy, alternatives